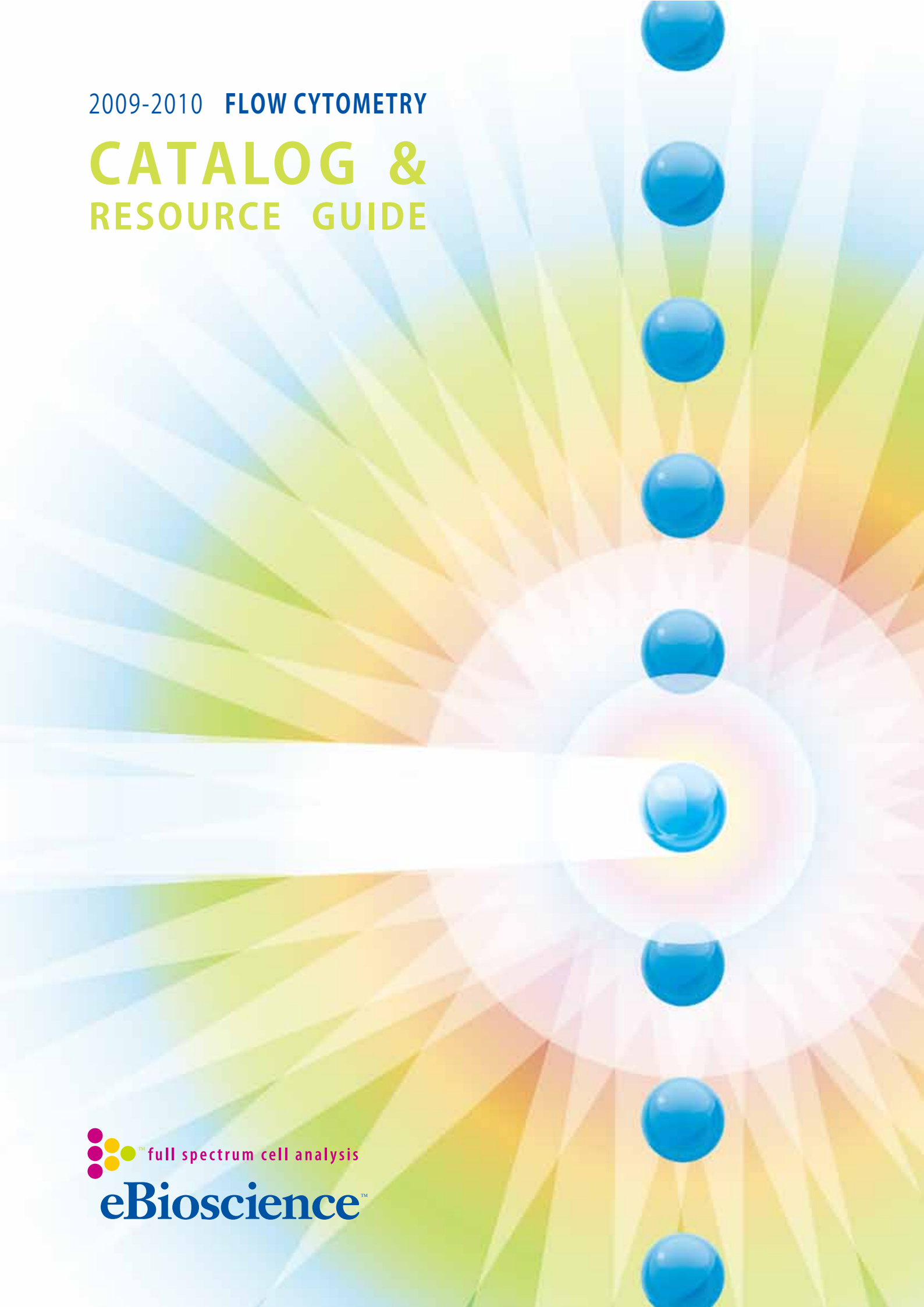
2009-2010 **FLOW CYTOMETRY**

CATALOG & RESOURCE GUIDE



™ full spectrum cell analysis

eBioscience™

FLOW CYTOMETRY

MULTICOLOR

THE FULL SPECTRUM CONCEPT

関連製品と技術

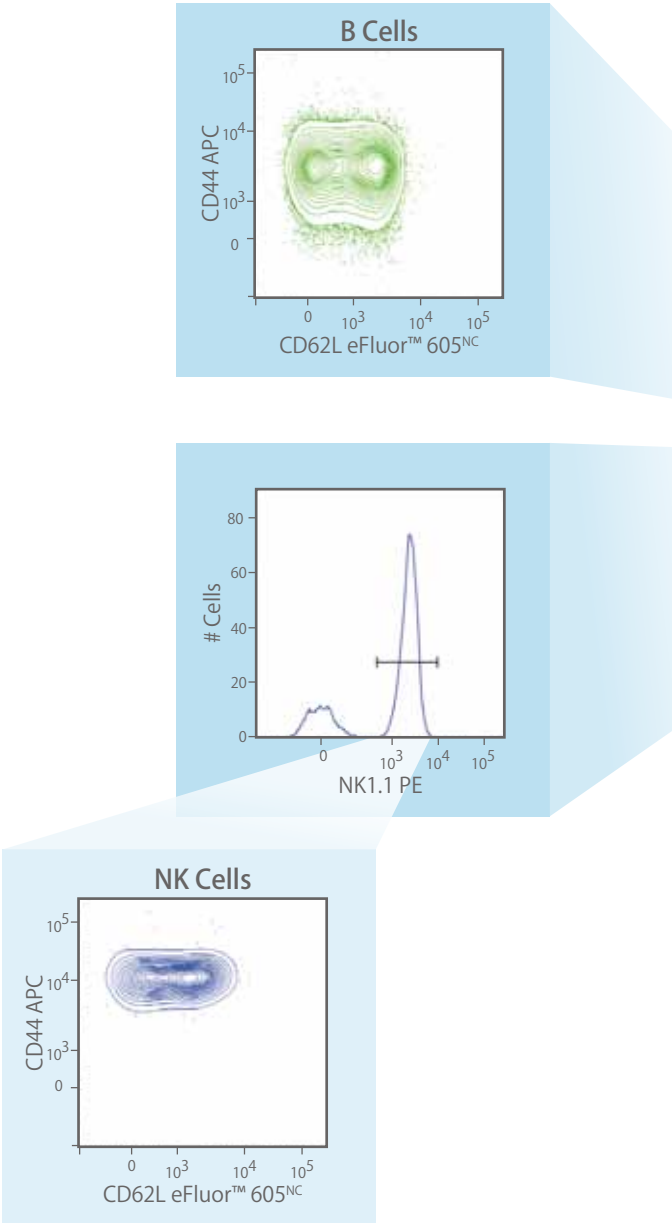
研究者はライフサイエンスにおいて最近の疑問に対しての答えを導くためにより洗練されたモデルシステムを構築しているので、この研究のための関連する製品の開発に後れを取らないようにしなければいけない。15以上の蛍光パラメーターの検出を可能にする3～5種類のレーザーを装備したフローサイトメターの開発はフローサイトメトリーのマルチパラメーター解析を進める上で必要である。フローサイトメトリーでマルチパラメータ解析の実力を実感するためには、一貫して信頼できるデータを保証する特異性と高性能の蛍光色素の有効性が必要となります。

マルチパラメーターのデータ

生物学システムを理解するためにそれらの組成の中の非常に雑多なポピュレーションを解析する能力が必要とされています。マルチパラメーター用のフローサイトメトリーは限られた検体量から多くのデータ類を取得するのを容易にし、染色パネルの中の特異的なバイオマーカーの発現レベルを個々の細胞で解析することを可能する機器となります。

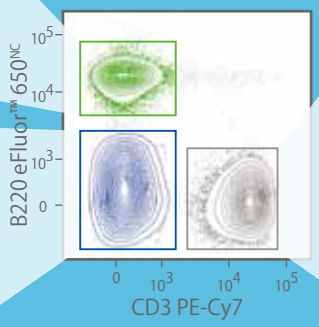
多重染色の最適化

我々のゴールはマルチパラメータ用のサイトメトリーに提供できる試薬で解析手法を導くことで、加えて広範囲で革新的なポートフォリオを構築し、マルチカラー解析に使用する最も適した蛍光色素を開発することに専心しています。これは一度に異なる蛍光色素の互換性を最大にしながら最適の蛍光に達することであり、信頼性高くかつ比較的容易にできるマルチカラーの染色パネルを設計することです。この発想を基に我々の新しい蛍光色素のブランドeFluorは有機化学物質とナノ結晶粒子体から成る2つの製品品目を取りそろえています。eFluorナノ粒子結晶体もeFluor有機色素もマルチカラーフローサイトメトリーにおいて高性能を発揮する試薬として設計されました。我々の研究開発チームはフローサイトメトリー適応の標的として最適の解像度を与える試薬を用意するために蛍光色素のポートフォリオを改善し拡張することを常日頃から行っています。マルチカラー染色パネルの設計を容易に統一できる最も効率の良い試薬を我々が供給することで、特異性と蛍光色素の組み合わせによる蛍光色素分子技術への投資と顧客への責任を我々は保証します。

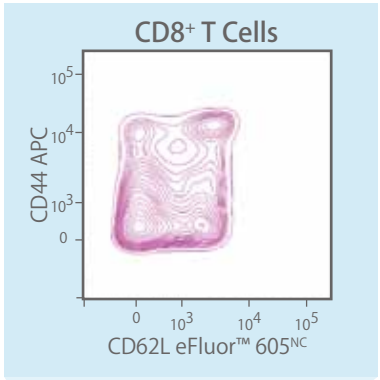


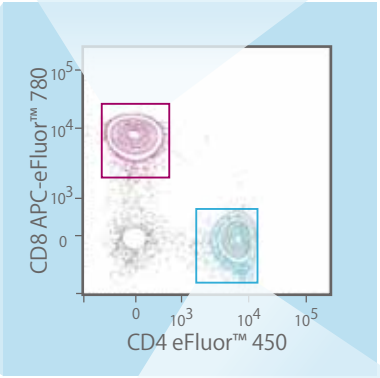
Multicolor phenotypic analysis of mouse splenocytes.

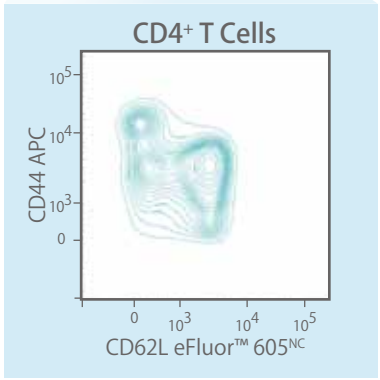
Mouse splenocytes were stained with the following panel of antibodies: eFluor™ 650^{NC} anti-mouse B220 (coming soon), PE-Cy7 anti-mouse CD3 (Cat. No. 25-0031), eFluor™ 450 anti-mouse CD4 (Cat. No. 48-0042), APC-eFluor™ 780 anti-mouse CD8 (Cat. No. 47-0081), PE anti-mouse NK1.1 (Cat. No. 12-5941), APC anti-mouse CD44 (Cat. No. 17-0441), and eFluor™ 605^{NC} anti-mouse CD62L



(Cat. No. 93-0621). The contour plots show the initial gating to discriminate the B220+ B cells (green) and CD3+ T cells (gray). The CD3+ cells are further subset into CD4+ (turquoise) and CD8+ (pink) populations. The non- B or T cell (B220-CD3-) population contains the NK1.1+ NK subset (blue histogram). The expression of CD44 and CD62L was evaluated on each of the lymphocyte subpopulations.







eBioscience provides antibodies conjugated to the most complete panel of high-quality fluorochromes and all the necessary support reagents to help you get the most out of your flow cytometry.

BUFFERS FOR FLOW CYTOMETRY

Flow Cytometry Staining Buffer:

eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer:

Foxp3 Staining Buffer Set:

IC Fixation Buffer:

Permeabilization Buffer:

eBioscience 1X RBC Lysis Buffer:

SUPPORT FOR FLOW CYTOMETRY

7-AAD Viability Staining Solution:

Propidium Iodide Staining Solution:

Anti-Mouse CD16/32 – blocks Fc-binding:

Human Fc γ R-Binding Inhibitor – blocks Fc-binding:

Brefeldin A Solution:

Monensin Solution:

FLOW CYTOMETRY

STEM CELL

WHERE IT ALL BEGINS

発見

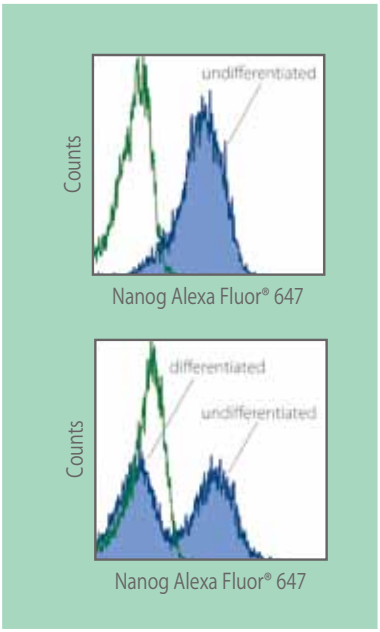
幹細胞生物学の分野は1961年にTillとMcCulloughによって造血幹細胞HSCの同定に起因している。その画期的な研究で彼らはマウスの骨髄細胞の際だったクローンに脾臓細胞のコロニー形成能を生じさせており、そしてＣＦＵ－Ｓを構成している全ての細胞群はただ一つのクローンから由来していることを証明している。現在は造血幹細胞HSCは限定された成熟段階により分化が進み、少しずつ多分化能を消失しながら様々なフェノタイプの血液細胞に至る。このように初期の段階から幹細胞生物学の定義は多くの他臓器の構成の説明にも応用されています。

多能性の定義

幹細胞の発見以来、それらの組織への再生能力は科学者の好奇心をそそっています。組織再生というゴールに向けての飛躍的な躍進となったのは2006年に山中伸弥博士のグループによって発表された、成体マウス線維芽細胞にレトロウイルスを用いて転写因子Oct3/4, Sox2, c-MycとKlf4を導入しiPS（人工多能性細胞）を誘導したことである。そして2007年にはこの手法はヒト幹細胞にまで発展し、同じ転写因子を使用しヒト線維芽細胞を多能性幹細胞へと再プログラムさせています。特筆すべきことに、この技術により樹立した幹細胞は幹細胞遺伝子の表現系、免疫不全マウスに投与したときの奇形種の発生、多くの組織系統への関与等をもとに判断すると胚性幹細胞と極めて類似していることが証明されています。

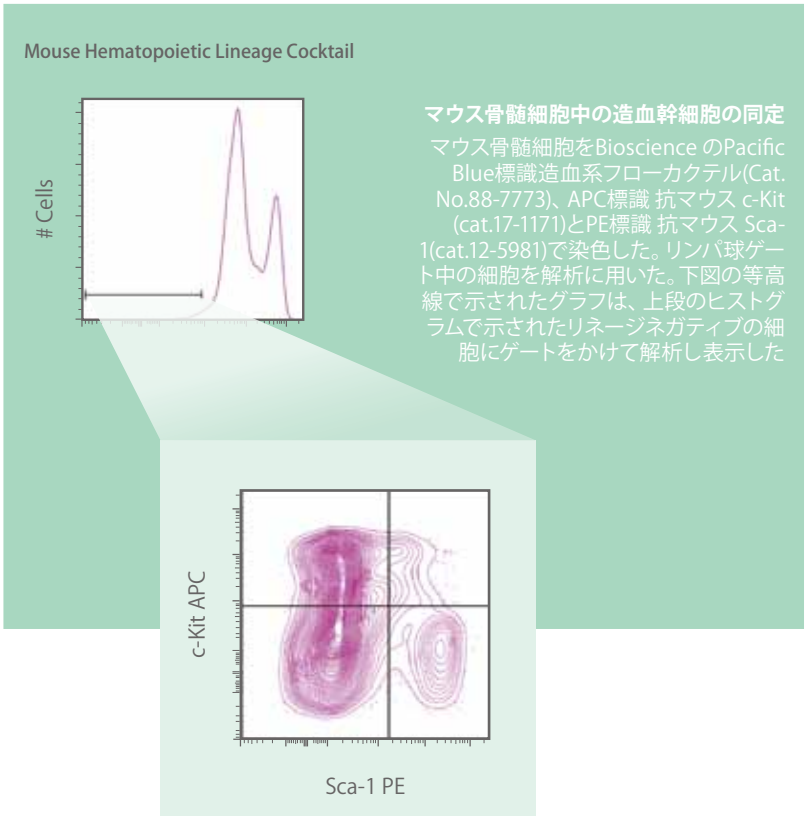
フローサイトメトリーによるナノーグの検出

全トランス型レチノイン酸で未処理（上段）または処理（下段）したF9細胞をAlexaFluor647標識抗マウスナノーグ（shaded histogram; Cat.No. 51-5761 ）とアイソタイプコントロール(open histogram)で染色した



Tumor	Phenotype
Acute Myeloid Leukemia (AML)	$CD34^{+}CD38^{-}$
B Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL)	$CD34^{+}CD10^{-}CD19^{-}$
T Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL)	$CD34^{+}CD7^{-}$ or $CD34^{+}CD4^{-}$
Myeloma	$CD138^{-}CD34^{-}$
Breast	$CD44^{+}CD24^{-/low}$
Medullo-blastoma	$CD133^{+}$
Glioblastoma	$CD133^{+}$
Head & Neck Sqamous Cell Carcinoma	$CD44^{+}$
Colon	$EpCAM^{hi}CD44^{+}CD166^{+}$ or $CD133^{+}$
Melanoma	$ABCB5^{+}$
Prostate	$CD44^{+}$
Pancreas	$CD44^{+}CD24^{+}EpCAM^{+}$ or $CD133^{+}$
Lung (non-small cell)	$CD133^{+}$
Hepatocellular	$CD44^{+}CD90^{+}$

Cancer Stem Cell Phenotypes.



マウス骨髄細胞中の造血幹細胞の同定

マウス骨髄細胞をBioscience のPacific Blue標識造血系フローカクテル(Cat. No.88-7773)、APC標識 抗マウス c-Kit (cat.17-1171)とPE標識 抗マウス Sca-1(cat.12-5981)で染色した。リンパ球ゲート中の細胞を解析に用いた。下図の等高線で示されたグラフは、上段のヒストグラムで示されたリネージネガティブの細胞にゲートをかけて解析し表示した

eBioscience offers an extensive selection of antibody reagents, cytokines and growth factors relevant to all areas of stem cell research including iPS cell, ES cell, hematopoietic stem cell and cancer stem cell research.

KEY PRODUCTS

CD34:

CD133:

Nanog:

Oct 3/4:

SSEA:

ESSENTIAL PRODUCTS

CD90:

CD117:

CD135:

CXCR4:

Sca-1:

この短期間に多くの重要な進歩がこの技術にもたらされています。既にiPS細胞はＡＬＳ（筋萎縮性側索硬化症）患者から誘導し運動神経へ再分化させることに成功しています。重要な取り組みとしては、ウイルスによる遺伝子導入に頼らずiPS細胞を誘導する方法が工夫されています。最終的には染色体に組み込まれないプラスミドで再プログラミング遺伝子を繰り返し導入しマウス線維芽細胞からiPS細胞を誘導できることが最近報告された。このiPS細胞ではゲノムへのプラスミドの組み込みを示す形跡は認められず、マウスに移植するとテラトーマを形成し、さらに成体キメラマウス生誕への寄与も認められた。

Stem Cells and Cancer

幹細胞学の特質は様々な悪性腫瘍との因果関係の研究に光をあてている。1997年、急性骨髄性白血病（AML）は大部分の癌細胞だけでは生存できず、僅かに存在するCD34陽性CD38陽性のフェノタイプの癌幹細胞（CSC）により生存維持できることが報告された。それ以来この概念は、表に示すような他の癌種においても癌の増殖に関与する癌幹細胞が存在していることに使われている。

References

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature. 1963 Feb 2;197:452-4.

Takahashi, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 131:861-872.

Bonnet, D., Dick, J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat. Med. 3:730-737.

FLOW CYTOMETRY
Th17

DECIPHERING Th17 CELLS

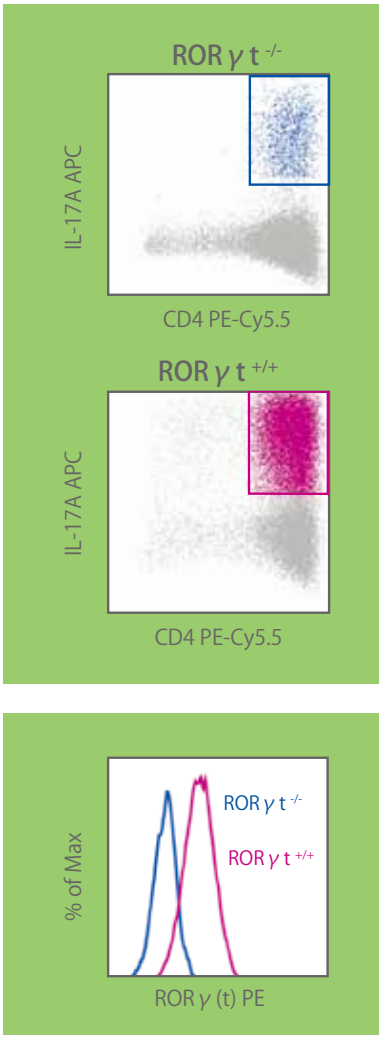
新しいT細胞系統

CD4ヘルパーT細胞は、細胞性免疫反応において重要な役割を果たします。長年、CD4ヘルパーT細胞は、サイトカインの発現パターンからTh1とTh2と呼ばれる二つの系統が存在すると考えられてきました。しかしながら、これらのサブセットの詳細な解析結果から、ヘルパーT細胞サブセットは2つに限定されないことが分かってきました。これまでに、T細胞が産生するIL-17（別名IL-17A）がいくつかの病原体に対する防御に必要であることは知られていましたが、2000年にIL-17Aは、あるユニークなヘルパーT細胞によって産生されることが明らかにされました。その後、T細胞はTh1やTh2分化とは非依存的に、in vitroやin vivoにおいてIL-17産生細胞へと分化することが明確に示されました。これにより、新たなヘルパーT細胞系統としてTh17細胞が確立されました。Th17細胞は機能的に、感染組織に好中球やマクロファージを動員し、病原体に対する宿主防御に重要な役割を果たします。またTh17細胞の調節異常は、多発性炎症や自己免疫疾患の原因になることも明らかにされてきました。Th17細胞の分化は、マスター・レギュレータ転写因子のRORγtによって調節されています。RORγtは、もともとRORγの胸腺特異的なアイソフォームとして同定された後に、Th17細胞でも発現することが確認されました。RORγtの欠損は、IL-17の産生減少とTh17の機能の低下を引き起こします。

Identification of Th17 cells by flow cytometric detection of RORγ(t).

CD4+ T cells were sorted from RORγt-deficient (top dot plot) or wildtype (bottom dot plot) mouse spleen and lymph node, cultured in Th17-polarizing conditions for 3 days and stained with anti-mouse CD4 PE-Cy5.5, anti-mouse IL-17A APC and anti-mouse/human RORγ(t) PE (Cat. No. 12-6988). The histogram shows staining of RORγ(t) in CD4+IL-17A+ events from RORγt-deficient mice (blue line) and wildtype mice (pink line). Cells in the lymphocyte gate were used for analysis.

Data provided courtesy of D.R. Littman Laboratory.

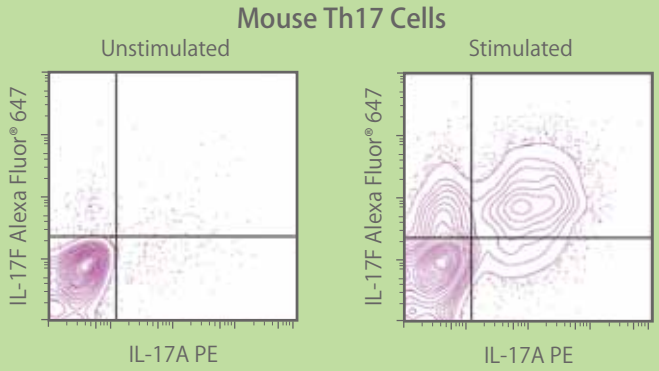


Feature	Th1	Th2	Th9	Th17	Treg
Surface Expression	IL-12Rb2, IFNγR, Tim-3	IL-4R, IL-17Rβ	?	IL-1R1, IL-23R, CCR6 (h), CD161 (h)	CD25, CD39, CD73, CD101, CD127^{lo}, FR4, GITR
Cytokine Expression	IFNγ	IL-4, IL-5, IL-13	IL-9	IL-17A, IL-17F, IL-17A/F, IL-21, IL-22	TGFβ
"Master Regulator" Transcription Factor	T-bet	Gata-3	?	RORγt	Foxp3
STAT Regulators	STAT-1, -4	STAT-6	?	STAT-3	STAT-5
Supportive Cytokines	IL-12, IL-27, IFNγ	IL-25 (IL-17E)	IL-4, TGFβ	TGFβ, IL-6, IL-21, IL-23	TGFβ

Properties of helper T cell lineages.

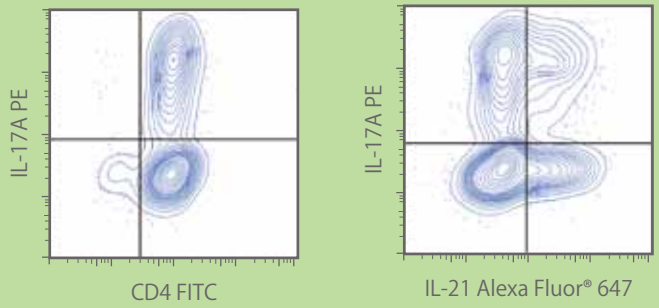
Th17サイトカイン解析

Th17細胞がTh1やTh2と異なる系統から成ることは、その分化を促進するために必要なサイトカインの解析結果から明らかにされました。Th1やTh2の分化に必要なサイトカインであるIFN-γやIL-4に非依存的に、TGF-βとIL-6がTh17細胞の分化誘導に相乗的に働きます。さらに、TNFとIL-1がこの効果を増強させます。IL-6は、IL-21産生を誘導し、またIL-23レセプターの発現を増強します。IL-21は、Th17分化をオートクラインに促進します。IL-23はIL-12のp40サブユニットを共用し、IL-17A産生を選択的に調節する最初のサイトカインとして示されました。現在では、TGF-βとIL-6がTh17の初期分化に働き、IL-23はIL-23レセプターの発現に伴い、Th17の発達増殖を調節することが明らかにされています。



Staining of IL-17A and IL-17F in Th17-polarized mouse splenocytes.

BALB/c splenocytes cultured for 3 days with anti-CD3/CD28, anti-IL-2, recombinant TGF-β and IL-6, followed by treatment with Brefeldin A alone (left) or with PMA, Ionomycin and Brefeldin A (right), then stained with anti-mouse IL-17A PE (Cat. No. 12-7177) and anti-mouse IL-17F Alexa Fluor® 647 (Cat. No. 51-7471). Cells in the lymphocyte gate were used for analysis.



Staining of IL-17A and IL-21 in Th17-polarized CD4+ human PBMC.

$CD4^+$ T cells were sorted from normal human peripheral blood, cultured for 3 days with anti-CD3/28, and then for 3 days with recombinant IL-1β and IL-23, followed by treatment with Brefeldin A, PMA and Ionomycin. Cells were then stained with anti-human IL-17A PE (Cat. No. 12-7179) and either anti-human CD4 FITC (Cat. No. 11-0049) (left) or anti-human IL-21 Alexa Fluor® 647 (Cat. No. 51-7219) (right). Cells in the lymphocyte gate were used for analysis.

eBioscience offers a complete portfolio of reagents for the analysis of Th17-related proteins including "master-regulator" transcription factors, cytokines and cell surface markers.

KEY PRODUCTS

CD161:

CD196 (CCR6):

IL-17A:

IL-17F:

ROR γ (t):

ESSENTIAL PRODUCTS

CD3:

CD4:

IL-6:

IL-12/IL-23 (p40):

IL-21:

更なる特徴づけ

最初にTh17が見出されて以来、Th17はIL-17A以外にもIL-17F（IL-17Aとヘテロダイマーを構成する）やIL-21, IL-22などといった他のサイトカインも産生することが明らかにされてきました。多くの注目がTh17のサイトカイン産生パターンに集中するなかで、最近、CD161とCCR6の細胞表面発現からTh17を同定することが可能であることが示されました。Th17の表現型をさらに明らかにしていくことは、このユニークなヘルパーT細胞の理解を進めていくことに重要です。

References

Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunol. 2008 May;8(5):337-48. Review.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1123-32.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.

FLOW CYTOMETRY
B CELL

THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE

初期の分化

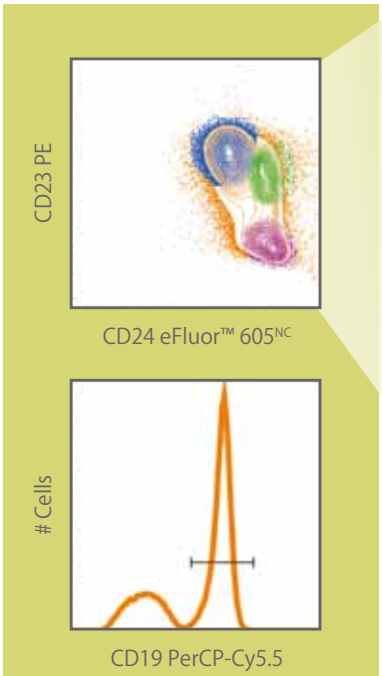
Ｂ細胞（ブルサあるいは骨髄由来）は、適応免疫反応において重要な役割を果たします。Ｂ細胞は、クローンごとに多様な免疫グロブリンＢ細胞レセプター（BCR）を細胞表面や分泌型で発現する細胞として定義されます。BCRは、抗原エピトープに特異的に結合します。Ｂ細胞の分化は、生前では胎児の肝臓で、そして成人では骨髄で起こります。また、その後の機能的な分化成熟は、二次リンパ組織で起こります。分化の初期には、プレBCRと呼ばれるBCRの前駆体が、Ｂ前駆細胞の継続的な分化と生存を確実にするために働きます。プレBCRによる分化の合図に加えて、Ｂ細胞分化は、IL-7、Flt3L、TSLPなどといったサイトカインの活性に依存します。さらに、核転写因子Pax5が、Ｂ細胞マーカーCD19の発現誘導と、他の細胞系統への分化抑制に働きます。

成熟

骨髄を出たＢ細胞は、脾臓に移動しさらに成熟して、CD21、CD23、CD24やAA4.1を発現する移行期を経て、最終的に濾胞Ｂ細胞に成熟します。Ｔ細胞依存性の免疫反応では、さらに二次リンパ組織において胚中心が誘導され、クラススイッチや体細胞突然変異が起こります。この二つのプロセスは、Activation-induced cytidine deaminase (AID)に依存します。

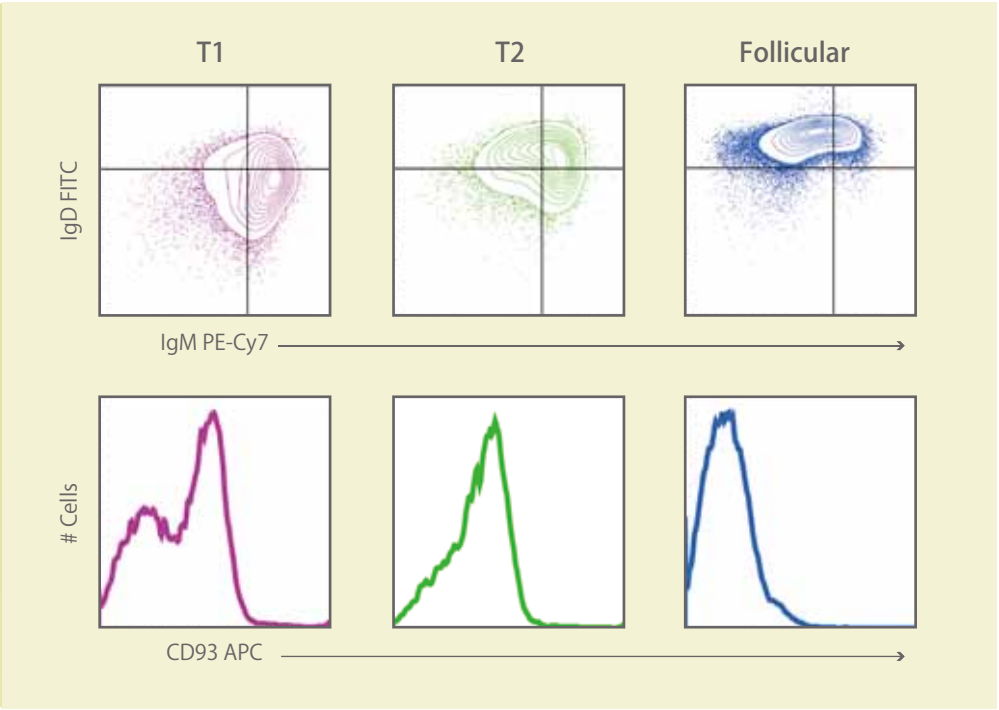
B cell phenotyping

Mouse splenocytes were stained with the following panel of antibodies: PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD19 (Cat. No. 45-0193), Pacific Blue® anti-mouse Gr-1 (Cat. No. 57-5931), Pacific Blue® anti-mouse CD11b (Cat. No. 57-0112), PE anti-mouse CD23 (Cat. No. 12-0232), eFluor™ 605^{NC} anti-mouse CD24 (Cat. No. 93-0242), FITC anti-mouse IgD (Cat. No. 11-5993), PE-Cy7 anti-mouse IgM (Cat. No. 25-5790) and APC anti-mouse CD93 (Cat. No. 17-5892). Following exclusion of Gr-1 and CD11b positive cells, CD19 positive cells were further analyzed based on expression of CD23 and CD24 to identify the T1, T2 and follicular subsets. IgD, IgM and CD93 expression on each subset is shown.



	Uncommitted			proB		preB		Immature	Transitional			Mature		
	HSC	ELP	'A'	B	C	C'	D	E	T1	T2	T3	FO	MZ	B1
CD45R (B220)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	++	+
CD19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD43		+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-/+
CD24 (HSA)	-	-	-	+	+	++	+	+	++	++	++	+	+	+
CD93 (AA4.1)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
BP-1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Surface IgM	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	++	++
Surface IgD	-	-	-	-	-	-	-	-	-/low	+	+	++	+/-	+/-
CD2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD22	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
CD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	++	++	+	+++	+/-
CD23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++	-	+/-
CD79a/CD79b (Ig α / β)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD127 (IL-7R α)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
c-Kit (CD117)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Phenotype of B cells during progressive stages of maturation from uncommitted progenitor to mature B cell.



eBioscience has an extensive selection of reagents to study all aspects of B cell biology including their development, function and pathogenesis.

KEY PRODUCTS

AID:

CD20:

CD66a:

FREB:

ESSENTIAL PRODUCTS

BP-1:

CD19:

CD45R (B220):

CD43:

CD93 (AA4.1):

クラススイッチでは、抗体の定常域を変えて、あるアイソタイプから他のアイソタイプに変換することができます。体細胞突然変異は、分化を促すプロセスで、CD5 B1細胞や辺縁帯Ｂ細胞などのより分化したＢ細胞サブセットの分化に関係すると考えられます。胚中心におけるＢ細胞の成熟は、メモリーＢ細胞や抗体産生細胞である形質細胞へと分化が誘導されます。形質細胞の分化は、転写因子BLIMP-1に依存します。Ｂ細胞は、体液性免疫反応における重要な役割に加えて、免疫ホメオスターシスのために多くの機能を仲介、調節しています。

疾患

Ｂ細胞も、潜在的に疾患の原因になります。伴性免疫不全症（XLA）は、Ｂ細胞の活性化に関わるブルトンチロシンキナーゼ（Btk）の変異によって起こります。またＢ細胞の分化異常は、種々の白血病やリンパ腫といった悪性形質転換を起こします。また自己に対して正しく寛容されなかったＢ細胞は、全身性エリテマトーデス（SLE）や関節リウマチ（RA）といった自己免疫疾患に関与します。

References

Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. Immunity. 2007 Jun;26(6):703-14. Review.

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1570-80. Review.

FLOW CYTOMETRY

Treg

REGULATING IMMUNE RESPONSES

免疫反応の制御

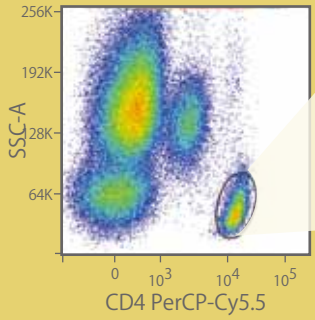
regulatory T細胞（Treg）が、免疫恒常性の維持に重要であることは、遺伝的および後天的なTreg細胞の欠損が成体の破滅に至ることから示されています。Tregは、他の免疫担当細胞に強い抑制性の制御をかけることにより、免疫システムの秩序を維持しています。Tregは、液性因子の分泌、細胞間の直接的な接触、細胞傷害等の多くの機構を介して免疫抑制作用を発揮するとされています。Tregの免疫制御機構の解析は、癌から自己免疫疾患までの多くの疾患の新規治療法の開発につながるものと注目されています。

Phenotypeと機能

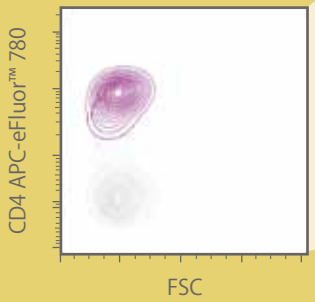
Foxp3 transcription factorの特異的発現に基づくTreg細胞の同定により、一般的なT細胞と比較してTreg細胞に発現変化の見られるいくつかのマーカーが見出されました。GITR, CTLA-4, CD39, CD73, CD101, CD103, CD127, FR4等のそれらのマーカーを下の表に示します。これらの分子のいくつかは、Treg細胞のバイオマーカーとしてのみならず、Treg細胞の機能にも関与することが知られています。たとえば、ecto-enzymeであるCD39やCD73は、細胞外核酸代謝に関与し、毒性のある細胞外ATPレベルの炎症組織内での低下に関与すると考えられています。また、CD39とCD73により細胞周囲で産生されるアデノシンは、活性化されたエフェクターT細胞表面のアデノシンA2Aレセプターに結合し、進行中の免疫反応を制御する免疫抑制ループのセットアップとして機能していると示唆されています。
これらの発見はTreg細胞上でのCD39およびCD73の発現増強の機能的意義を示しています。さらにCTLA-4がFoxp3を発現するTreg細胞のin vitroおよびin vivoでの免疫抑制機能に重要であることも最近報告され

ANTIGEN	HUMAN	MOUSE	RAT
CD4	●	●	●
CD25	◎	●	●
CD39	◎	◎	
CD62L	◎	◎	◎
CD73		◎	
CD101	◎	◎	
CD103	◎	◎	◎
CD127	▼		
CD134	◎	◎	◎
CD152 (CTLA-4)	◎	◎	
CD223 (LAG-3)		◎	
Foxp3	●	●	●
FR4		◎	
GITR/AITR	◎	◎	
IL-10	◎	◎	
TGF-β	◎	◎	

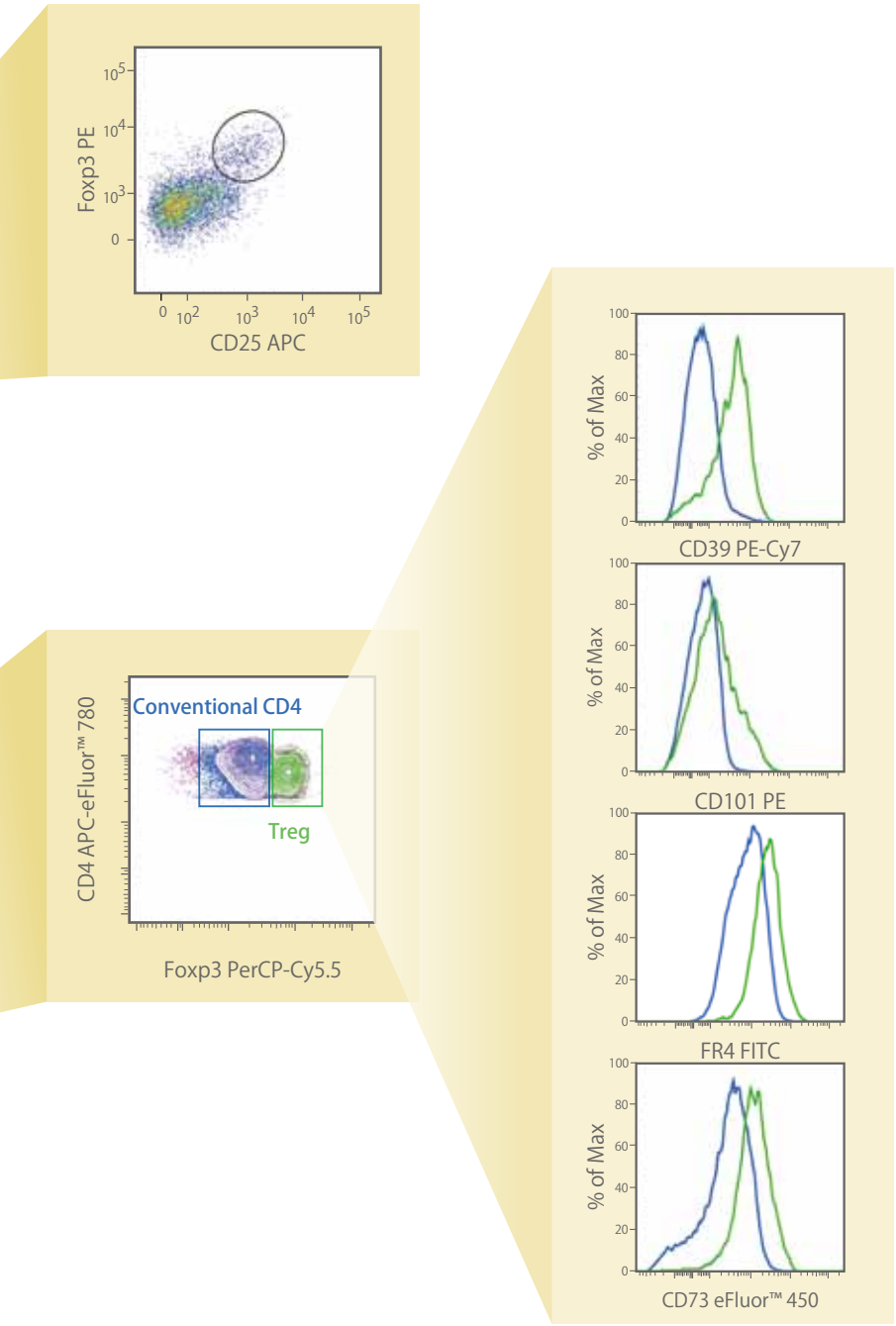
Reported phenotypic profile of Treg cells. ● Pan Marker ◎ Subset ▼ Down -regulated



ヒト全血Foxp3染色キット
健常人末梢血を、PerCP-Cy5.5標識抗ヒトCD4抗体 (Cat. No. 44-0048)(左のパネル)と、APC標識抗ヒトCD25抗体（Cat. No. 17-0259）(右のパネル)で細胞表面を染色した後に溶血し、ヒト全血Foxp3染色キット(Cat. No. 88-8996)を用いてFoxp3の細胞内染色を行った。



マウスTreg細胞のマルチカラー解析
マウス脾細胞を、APC-eFluor 780標識抗マウスCD4抗体(Cat. No. 14-0042)、PerCP-Cy5.5標識抗マウスFoxp3抗体(Cat. No. 45-5773)、FITC標識抗マウスFR4抗体(Cat. No. 11-5445)、PE標識抗マウスCD101抗体(Cat. No. 12-1011)、PE-Cy7標識抗マウスCD39抗体（Cat. No. 25-0391）、およびeFluor 450標識抗CD73抗体(Cat. No. 48-0731)で染色した。Counter plot上で、一般的なCD4T細胞（青）とFoxp3+CD4+のTreg細胞(緑)に分けてゲートをかけ解析した。ヒストグラムで、それぞれの分子のCD4T細胞（青）とTreg細胞(緑)上での発現を示す。



eBioscience is the industry leader in providing reagents to analyze Tregs including Foxp3 antibodies, and new antibodies for sorting of highly purified viable Tregs.

KEY PRODUCTS

CD39:

CD73:

CD101:

FR4:

Human Foxp3 Whole Blood Staining Kit:

ESSENTIAL PRODUCTS

CD4:

CD25:

CD127:

Foxp3:

AITR/GITR:

ました。初期の免疫抑制機構には、樹状細胞上の補助刺激分子の発現抑制が関与しています。そして最終的に、マウスTreg細胞上にはCD101が発現し、この分子の発現が抑制性細胞の免疫抑制能の強さと相関することが報告され、CD101は機能的に最も重要なTreg細胞の同定に有用なマーカーとして使用できる可能性が示唆されています。Treg細胞の免疫抑制機構は活発に研究されており、いくつかの重篤な疾患の発症に関与し、その機能を制御することで治療に結びつく分子が見出されることしょう。

References:

Fernandez, I., et al. 2007. CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. J. Immunol. 179:2808-2814.

Deaglio, S., et al. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J. Exp. Med. 204:1257-1265.

Wing, K., et al. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science. 322:271-275.

FLOW CYTOMETRY

APOPTOSIS

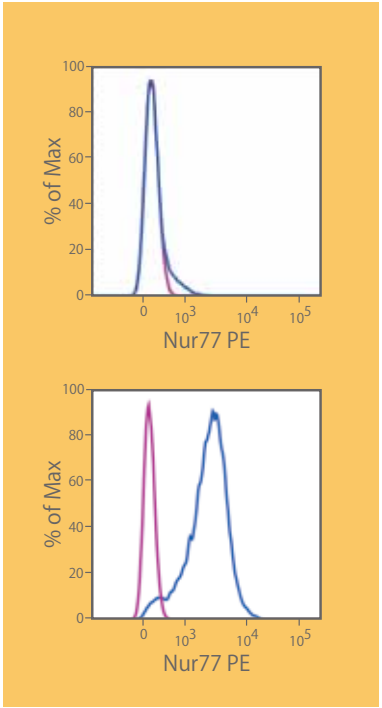
PROGRAMMED CELL DEATH

誘導、活性化そして実行

Apoptosis（アポトーシス）は、生体組織のホメオスタシスの維持と進化の過程において重要な役割をはたしている高度に制御された細胞死です。哺乳類におけるApoptosisの進行は誘導（induction）, 活性化（activation）そして実行（execution）の3つのステップに分けられます。Apoptosisは、UV照射、DNAを損傷する試薬、化学療法剤等が引き金となり内在的なアポトーシス経路を活性化します。内在性のアポトーシス経路はミトコンドリア外膜の透過性mitochondrial outer membrane permeabilization(MOMP)により制御され、チトクロームCの遊離、Apaf-1への結合、そしてプロアポトーシスタンパクを遊離させます。外因性の経路は、Fasのようなdeathレセプターが特異的なリガンドに結合することで活性化されます。 内在性および外在性経路のいずれの場合もアポトーシス活性化段階の初期に集中しています。この段階では、caspase（カスパーゼ）と呼ばれるシステインプロテアーゼを分解・活性化します。caspaseは細胞質内では不活化のpro-enzymeとして存在し、他のcaspaseまたは蛋白質ー蛋白質の相互作用により活性化されます。最終的にApoptosisの実行過程はDNAの断片化、核の凝集、細胞膜の変化等の形態的な変化を起こし、これらの細胞構造の変化は全てcaspaseの活性化により誘導されます。アポトーシスはそもそも細胞内の形態学的変化の進行に基づくもので、最近のアポトーシス研究の多くの進展にもかかわらず未だにアポトーシスが起きていることは形態的変化が使われています。

Nur77 staining of apoptotic cells.

Mouse thymocytes were prepared as a single cell suspension and either left unstimulated (top) or stimulated with PMA and ionomycin (bottom) for 2 hours at 37°C. Samples were stained intracellularly with PE mouse IgG1 isotype control (Cat. No. 12-4714) (pink histogram) or PE anti-mouse Nur77 (Cat. No. 12-5965) (blue histogram). Intracellular staining was performed using the Foxp3 Staining Buffer Set (Cat. No. 00-5523).

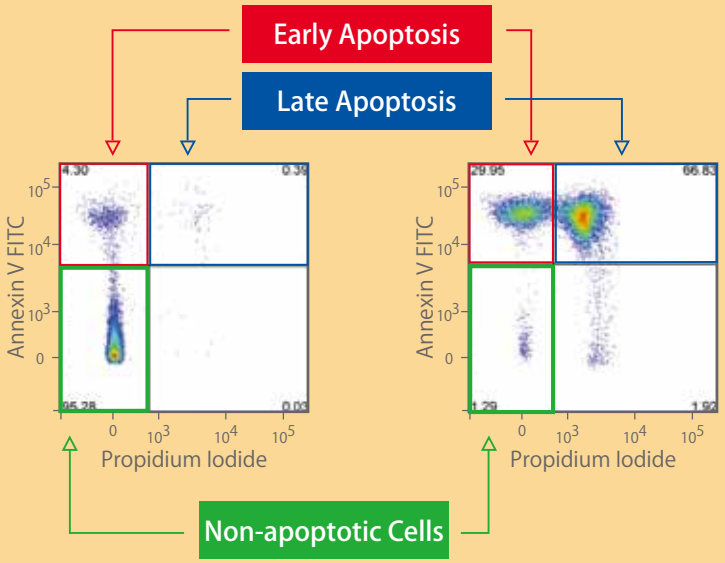


細胞膜の初期段階の変化

アポトーシスを最も早い段階で検出できるマーカーとしてフォスファチジルセリン（PS）の細胞表面への発現があります。アポトーシスを起こしている細胞は細胞膜の内側から外側に移行することが知られており、細胞膜表面にＰＳを検出することができます。重要なことはこのアポトーシスの初期段階では細胞膜はまだ正常です。カルシウムイオンCa2+存在下でアネキシンＶ蛋白はＰＳと高い結合能を有しており、細胞表面に発現しているＰＳに結合できます。フローサイトメトリーを使用することにより、カルシウムイオン依存的に蛍光標識したアネキシンＶにより発現したＰＳを検出することができます。

後期段階でのＤＮＡ断片化

ＤＮＡ断片化はアポトーシスの顕著な特徴の一つです。核内ＤＮＡはまず最初に大きな断片（50-200kb）に分断され、その後小さなヌクレオソームユニット（180-200 base pair）に切断されます。このように小さくＤＮＡを切断すると3'末側にフリーの水酸基が生じ、BrdUTP存在下でターミナルデオキシヌクレオチド転換酵素(TdT)の酵素反応によりできる5'-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)を末端にラベルすることができます。BrdUを可視化するには蛍光標識抗BrdU抗体を用いた免疫反応で検出することができます。これはプロトコールを実施するのに必要な全ての試薬が含まれているキットを用いると簡単に検出することができます。APO-BRDUキット（カタログ番号88-6671）は細胞内全DNAと小さく切断されたDNAを2カラー染色する方法でアポトーシスしている細胞をフローサイトメトリーで検出する製品です。そのために緑色蛍光（515nm）と赤色蛍光（635nm）の2色を検出できるフローサイトメトリーを最小限必要とします。このキットは説明書とアポトーシスを検出するための全ての試薬、ポジティブおよびネガティブコントロールの細胞、それぞれの反応段階で必要な洗浄溶液、反応溶液、リンス溶液、ターミナルデオキシヌクレオチド転換酵素（TdT）、ボロモデオキシヌクレオチド３リン酸（Br-dUTP）、切断DNAを標識する抗BrdU抗体、全DNAを染色するプロピジウムイオダイド（PI）とRNaseA溶液が含まれています。DNAの切



Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit.

Mouse thymocytes were prepared as a single cell suspension and incubated overnight at 37°C in medium (left panel) or medium with 1 μM dexamethasone (right panel). Cells were harvested and stained using the Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Cat. No. 88-8005) and Propidium Iodide Staining Solution (Cat. No. 00-6990).

eBioscience has a variety of tools to allow the phenotyping and characterization of cells undergoing apoptosis.

KEY PRODUCTS

Annexin V Apoptosis Detection Kit (FITC, APC):

APO-BrDU Apoptosis Detection Kit:

APO-DIRECT™ Apoptosis Detection Kit:

Propidium Iodide:

Nur77:

ESSENTIAL PRODUCTS

Bcl-2:

Cytochrome C:

CD95 (Fas):

CD178 (FasL):

TRAIL:

断はアポトーシスの後期過程で観察でき９５%の細胞で認められますが、TUNELアッセイはアポトーシスを検出できるただ一つの方法ではありません。何故ならばDNA断片化は全てのアポトーシスを起こしている細胞で認められるわけではありませんし、時に検出が困難な場合があるからです。

References:

Darzynkiewicz, Z., Huang, X., and Okafuji, M. (2006). Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cyometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). Methods Mol Biol. 314, 81-93.

FLOW CYTOMETRY

NK(T) CELL

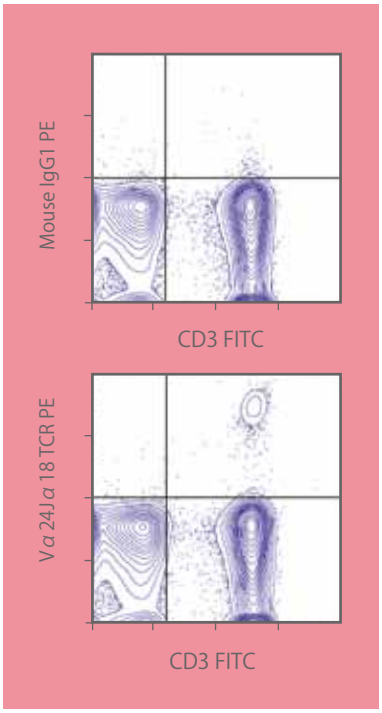
BRIDGING INNATE & ADAPTIVE IMMUNITY

細胞傷害

NK細胞は癌細胞への特徴的な細胞傷害活性により見出され、現在では独立したリンパ球群として認識されています。NK細胞の特徴的な細胞傷害活性の発揮に基づき、全く新しい標的細胞の認識機構として「missing self仮説」が提唱されました。この基本原理の検証を経て、抑制性レセプターとそのリガンドおよび活性型レセプターとそのリガンドの結合により伝達されるシグナルのバランスにより、NK細胞の細胞傷害活性が制御されていることが示されました。抑制性NK細胞レセプターは、標的細胞上のMHC Class Iに代表される自己の分子を認識し、この結合によりNK細胞に抑制性のシグナルが伝達され、このため標的細胞はNK細胞からの細胞傷害からまぬがれます。自己の分子が欠損すると、標的細胞はNK細胞の細胞傷害機能タンパクであるperforinやgranzyme Bにより殺傷されます。この抑制性NK細胞レセプターには、マウスのレクチン様Ly49ダイマー分子群、ヒトのイムノグロブリン様レセプター群(KIR)、およびマウスでもヒトでも存在するレクチン様CD49-NKG2Aヘテロダイマーがあります。一方、活性型NK細胞レセプターにはNKG2D等があり、ストレス下の細胞に発現する分子を認識し、標的細胞の殺傷を誘導します。

免疫反応調整機能

癌化細胞の殺傷による除去に加え、NK細胞はウイルス感染の防御においても重要な役割をしています。ゆえに、ウイルスはNK細胞から逃れるために、抑制性レセプターに対するいくつかの偽のリガンドを発現するよう進化しました。細胞傷害活性やIFN-g産生の抑制などのNK細胞の活性の欠損により、マウスはウイルスに感染しやすくなります。ごく最近になって、NK細胞は樹状細胞、T細胞、B細胞、血管内皮細胞を含む多くの細胞に対して抑制作用を有し、免疫反応において調整的役割を担っていることが明らかにされてきました。たとえば、NK細胞は樹状細胞を傷害し、これにより樹状細胞の数を制限し、T細胞への抗原提示機能を制御しています。さらに、サイトカインの産生や抑制性リガンドの発現が低下した細胞の傷害により、B細胞やT細胞の活性にも直接的に影響を及ぼします。最近、NKp46+RORgt+IL-22+のNK細胞が腸管で見出され、リンパ組織の構築や組織の修復に関与することが見出されました。



ヒトNKT細胞における Va24Ja18T細胞レセプターの発現

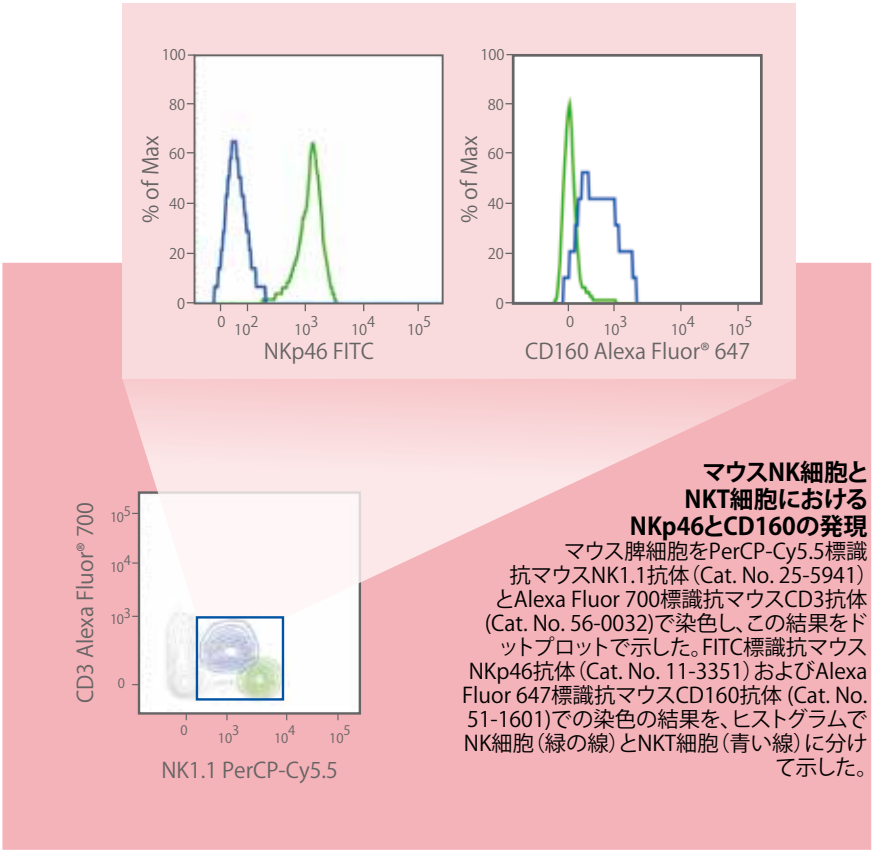
健常人の新鮮末梢血から単核球を分離し、FITC標識抗ヒトCD3抗体（Cat. No. 11-0038）とPE標識マウスIgG1アイソタイプコントロール(Cat. No. 12-4714)（上）またはPE標識抗ヒトVa24Ja18T細胞レセプター抗体(Cat. No. 12-5806)（下）で染色した。

Feature	NK	Type I NKT (Classical)	Type II NKT
Phenotype	$CD3^-TCR^-CD94^+NKp46^+$	$CD3^+TCR^+CD94^+NKp46^-$	$CD3^+TCR^+$
TCR rearrangement	—	semi-invariant mouse: Vα14Jα18 human: Vα24Jα18	variant
CD1d-restricted	—	yes	yes
αGalCer-reactive	—	yes	no

Surface expression and functional differences between NK and NKT cells.

NKT細胞

NKT細胞はT細胞とNK細胞の特性と表面マーカーの発現を兼ね備えた特異な細胞集団です。この細胞は当初、CD1d拘束性である



マウスNK細胞と NKT細胞における NKp46とCD160の発現

マウス脾細胞をPerCP-Cy5.5標識抗マウスNK1.1抗体（Cat. No. 25-5941）とAlexa Fluor 700標識抗マウスCD3抗体(Cat. No. 56-0032)で染色し、この結果をドットプロットで示した。FITC標識抗マウスNKp46抗体（Cat. No. 11-3351）およびAlexa Fluor 647標識抗マウスCD160抗体 (Cat. No. 51-1601)での染色の結果を、ヒストグラムでNK細胞（緑の線）とNKT細胞（青い線）に分けて示した。

eBioscience offers a complete portfolio of reagents for the analysis of both NK and NKT cells by flow cytometry, immunoassay and bioassay.

KEY PRODUCTS

CD158a/f:

CD160:

Eomes:

NKp46:

Vα24Jα18 TCR:

ESSENTIAL PRODUCTS

CD49b:

CD94:

NK1.1:

NKG2D:

Perforin:

ことを特徴とする、CD3/T細胞レセプター複合体を弱く発現するNK1.1発現T細胞として見出されました。Classical　NKT細胞またはType I NKT細胞は、マウスではVa14Ja18ヒトではVa24Ja18のinvariantなT細胞レセプターを発現するinvariant NKT (iNKT)細胞で、CD160等のマーカーを発現しています。CD1d拘束性のNKT細胞のサブセットとして、多様なT細胞レセプターを発現するtype II NKT細胞が報告されていますが、その詳細は不明です。

References:

Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. Nature. 1986 Feb 20-26;319(6055):675-8.

Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. Science. 1994 Mar 25;263(5154):1774-8.

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008 May;9(5):503-10. Review.

FLOW CYTOMETRY

DENDRITIC CELL

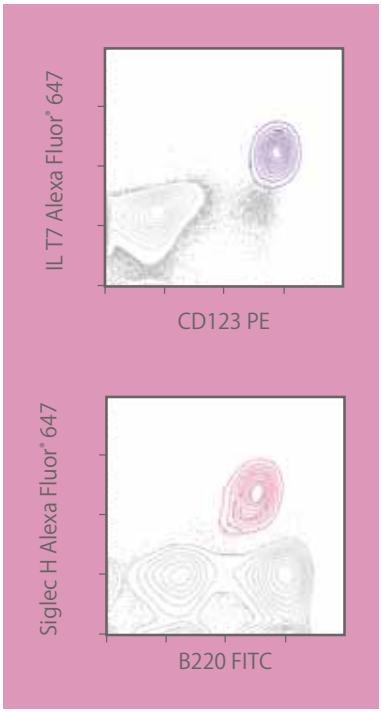
DIRECTING AN IMMUNE RESPONSE

抗原提示

樹状細胞（DC）は、抗原に対してナイーヴＴ細胞を活性化することができるプロフェッショナル抗原提示細胞です。樹状細胞の種類に応じて、また樹状細胞-Ｔ細胞相互作用の生理的条件に応じて、Ｔ細胞活性化の機能性が調整されています。ナイーヴＴ細胞の活性化に加えて、樹状細胞はＴ細胞寛容や調節性Ｔ細胞の分化を誘導する役割も果たすと考えられています。

Conventional DC

樹状細胞は、骨髄でCD34先駆幹細胞から生じる極めてヘテロな細胞集団です。種々の樹状細胞サブセットの存在が、ヒトとマウスで確認されており、細胞表面分子マーカーと局在に基づいて分類されています。古典的な樹状細胞サブセットの移動パターンは、厳しく調節されており、免疫系の見張り役として機能を発揮します。これにより微小環境における安定した監視と、優れた抗原の捕獲、輸送、処理、提示を容易にしています。通常、樹状細胞は適切な免疫反応を確実に始める為に抗原提示を行います。監視は、末梢組織で絶え間なく抗原を採取するという他に類のない能力を持つ未熟な樹状細胞によって主に行われています。樹状細胞は、レクチン領域を持つレセプターやToll様レセプターなどのセンサーを備えています。これらのレセプターは、通常環境で起こる混乱、例えば病原体の存在と細胞死が誘発する炎症状態を識別することができます。これらのレセプターの活性化に伴い、成熟のプロセスが進行



Identification of human and mouse plasmacytoid dendritic cells.

Top panel: Staining of normal human peripheral blood cells with PE anti-human CD123 (Cat. No. 12-1239) and Alexa Fluor® 647 anti-human ILT7 (Cat. No. 51-5179) to identify the pDC population.

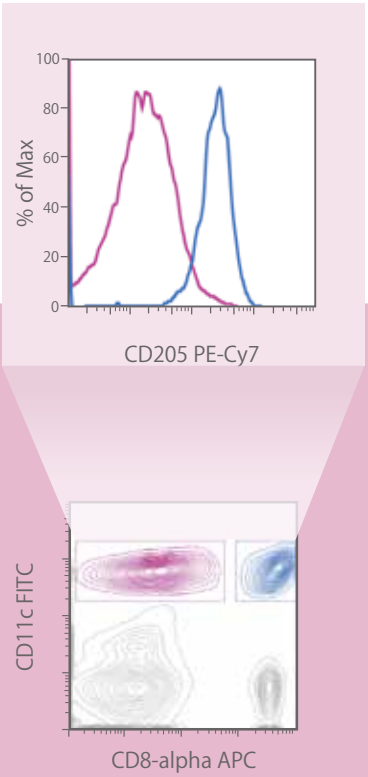
Bottom panel: Staining of mouse splenocytes with FITC anti-mouse B220 (Cat. No. 11-0452) and Alexa Fluor® 647 anti-mouse siglec H (Cat. No. 51-0333) to identify the pDC population.

HUMAN				
	Monocyte-derived	Plasmacytoid-derived	Interstitial	Langerhan
MHC-II	●	● (low)	●	●
MHC-I	●	●	●	●
CD1a	●	×	×	●
CD11c	●	×	●	●
CD11b	●	×	●	●
CD4	●	●	●	●
CD85g (ILT7)	×	●	×	×
CD85k (ILT3)	●	●	×	×
Langerin	×	×	×	●
CD123	×	●	×	◎

MOUSE				
	Monocyte-derived	Plasmacytoid-derived	Interstitial	Langerhan
MHC-II	●	● (low)	●	●
MHC-I	●	●	●	●
CD11c	●	● (low)	●	●
CD11b	●	×	◎	●
CD4	●	◎	◎	●
CD8a	×	◎	◎	×
CD205	●	● (low)	◎	●
B220	×	● (low)	×	×
Langerin	×	×	×	●
E-Cadherin	×	×	×	●
Siglec H	×	●	×	×
PDCA-1	×	●	×	×
GR-1	×	●	×	×
CD123	×	●	×	×

Human/Mouse Dendritic Cell Biomarkers

● Expressed ◎ Subset × Not Expressed



CD205 (DEC205) expression on mouse dendritic cell subsets.

Mouse splenocytes were prepared as a single cell suspension and stained with PE-Cy7 anti-mouse CD205 (Cat. No. 25-2051), FITC anti-mouse CD11c (Cat. No. 11-0114), and APC anti-mouse CD8α (Cat. No. 17-0081).

The histograms (top) demonstrate staining of CD205 on CD11c+CD8α- cells (pink histogram) and CD11c+CD8α+ cells (blue histogram), as gated in the contour plot (below).

eBioscience has an extensive selection of reagents for studying all subsets of dendritic cells including Langerhans cells, and monocyte-, plasmacytoid- and interstitial-derived dendritic cells.

KEY PRODUCTS

CD85g (ILT7):

CD205 (DEC205):

CD317 (PDCA-1):

MHC I K^b/SIINFEKL:

siglec H:

ESSENTIAL PRODUCTS

CD11c:

CD80:

CD86:

CD207 (Langerin):

CD209 (DC-SIGN):

し、最終的に二次リンパ組織で強力にＴ細胞を活性化することができる樹状細胞に表現系や遊走性が変化します。成熟した樹状細胞は、CD83やケモカイン・レセプターCCR7、補助刺激分子のCD80、CD86、CD40やCD54の発現が増強します。

Plasmacytoid DC

Plasmacytoid DC(pDC)は、ユニークな樹状細胞サブポピュレーションで、ウイルスに反応して大量のＩ型インターフェロンを産生します。リンパ系を循環するConventional DCとは異なり、pDCは血管を循環し、炎症性シグナルに反応して二次リンパ組織に移行します。ヒトpDCは恒常的にILT7とCD123を発現し、IL-3に生存を依存しますが、マウスpDCは異なる表現系を示し、細胞表面マーカーSiglec HとPDCA-1の発現によって同定することができます。

将来的なアプリケーション

樹状細胞が抗原刺激に応じて機能的なT細胞反応を作り出すという役割は、免疫調節療法において非常に魅力的な対象であり、おそらく今後も免疫学における最もトピックな存在であり続けることでしょう。樹状細胞の研究をサポートする試薬の発展は、新しいモデルと技術の進歩を助け、樹状細胞生物学の理解を広げていくことになるでしょう。

References:

Shortman, K., Liu, Y-J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat. Rev. Immunol. 2:151-161.

Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y-J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat. Immunol. 5:1219-1226.

Randolph, G., Ochando, J., Partida-Sanchez, S. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. Annu. Rev. Immunol. 26:293-316.

Merad, M., Ginhoux, F., Collin, M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. 8:935-947.

RESOU

FLOW CYTOMETRY PROTOCOLS

CELL PREPARATION

TISSUE CULTURE CELLS / FRESH TISSUE / PERIPHERAL BLOOD

IMMUNOFLUORESCENT STAINING

CELL SURFACE ANTIGENS / INTRACELLULAR STAINING / DETECTING APOPTOTIC CELLS

JRCE GUIDE

TECHNICAL NOTES

LIGHT SCATTER PROPERTIES

CHOOSING FLUOROCHROMES

SPECTRAL OVERLAP & COMPENSATION

FLOW CYTOMETRY
PROTOCOLS

Section I: Cell Preparation

General Notes:

1. フローサイトメトリ用ーのサンプルの最適な染色には、単細胞懸濁液が必要です。
2. サンプルが通過する注射針とサンプルチューブは、細胞の凝集塊やデブリスにより、詰まることがあります。
3. 固形組織から単細胞懸濁液を調製する際には、組織から細胞を最適に回収するために機械的解離および/または、酵素消化を必要とします。目的とする組織の消化のための条件と酵素要件は、経験的に決定される必要があります。

固形組織から細胞分離を行うためのガイドラインに役立つサイト
www.tissuedissociation.com

I-A. 組織培養細胞の細胞調製

試薬/器具:

- Accutase™ Enzyme Cell Detachment Medium (eBioscience Cat. No. 00-4555)
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat. No. 00-4222)
- 15 or 50 ml conical centrifuge tubes

1. 懸濁液中で増殖している細胞の場合は、円錐形の遠心分離機チューブの中に細胞を静かに注ぎ、セルカウントと生存率解析を行います。
   ステップ３に移ります。

2. 接着細胞株の場合は、培養皿から細胞を引き離し、細胞集合体を分離する為にAccutase™ Enzyme Cell Detachment Mediumを用いることをお奨めします。円錐形の遠心分離機チ ューブの中に細胞をセットし、セルカウントと生存率解析を行います。
   ステップ３に移ります。
   NOTE：Accutaseは、いくつかの細胞表面抗原決定基を変化させます。その効果は、評価される抗原決定基で経験的に決定される必要があります。

3. 細胞を遠心分離し、最終的な細胞濃度が2×10^7/mlになるように、Flow Cytometry Staining Bufferを適量使って再懸濁します。

I-B. リンパ組織からの細胞調製

リンパ組織の機械的な破砕は、通常、単細胞懸濁液へ細胞を取りだすには十分です。

試薬/器具:

- 60mm×15mm組織培養皿
- 3ml　注射器
- セルストレーナー（ナイロンメッシュ）
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat.No.00-4222)
- 15あるいは50mlの円錐型遠心分離チューブ

1. 組織培養皿の中へ組織（脾臓、リンパ節、胸線）を採取し、3ml注射器のプランジャーを使用した圧迫によって、単細胞懸濁液へと分離させます。（別法として、10mlのFlow Cytometry Staining Bufferを用いて、冷やした2枚のフロストスライドグラスの間ですりつぶします）
2. 10mLのFlow Cytometry Staining Bufferの中に細胞を回収し、細胞の塊とデブリスを取り除く為に細胞懸濁液をセルストレーナーに通します。コニカルチューブの中に細胞懸濁液を集めます。
3. 細胞懸濁液を4~5分間（300~400×g）4℃で遠心分離し、上清を廃棄します。
4. 細胞のペレットを再懸濁し、セルカウントと生存率解析を行います。
5. Step3同様に、細胞を遠心分離し、最終的な細胞濃度が2×10^7/mlになるように、適量のFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁します。

I-C. 非リンパ組織からの細胞調製

試薬/器具:

- Scissors or scalpel blade
- PBS or other suitable buffer
- 60mm×15mm組織培養皿
- セルストレーナー（ナイロンメッシュ）
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat.No.00-4222)
- 15あるいは50mlのコニカルチューブ

1. 組織を採取し、ハサミあるいは手術用のメスを用いて、2-4mm角に刻みます。
2. 適量のPBSで希釈した酵素を加え、酵素の製造取扱説明書に従い最適な時間、温度でインキュベートします。
   NOTE:使用に適した酵素は、組織によって変わります。；www.tissuedissociation.comは、特定の組織未知の組織で最適な酵素を知らない場合に、スタート時の酵素量を決定する際に役立つサイトです。
3. 穏やかにピペットすることで細胞を分散させ、細胞の塊とデブリスを取り除く為に細胞懸濁液をセルストレーナーに通して濾過します。コニカルチューブの中に細胞懸濁液を集めます。
4. 細胞懸濁液を4~5分間（300~400×g）4℃で遠心分離し、上清を廃棄します。
5. 細胞ペレットをPBSで再懸濁し、余分な酵素溶液を取り除きます。
6. Step4と同様に、4℃で遠心分離します。
7. .Step5と6を繰り返します。
8. Flow Cytometry Staining Bufferで細胞のペレットを再懸濁し、セルカウントと生存率解析を行います。
9. Step4同様に、細胞を遠心し、最終的な細胞濃度が2×10^7/mlになるように、適量のFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁します。

I-D. 全血からのPBMC単離用手順

試薬/器具:

- PBS
- Ficoll ® or other density separation medium
- eBioscienceTM Flow Cytometry Staining Buffer(eBioscience Cat.No.00-4222)
- 15あるいは50mlのコニカルチューブ

1. 血液サンプルを50mlコニカルチューブ中でPBSで1：1に希釈します。
2. 元のサンプルと等量のFicoll ®に、希釈したサンプルを重層します。
3. ブレーキをオフにして、20分間（700×g）遠心します。
4. 新たなチューブの中に、リンパ球層からPBMCを採取します。
5. チューブにPBSを満たし細胞を洗います。
6. 細胞懸濁液を4℃で4-5分間（300-400×g）遠心し、上清を廃棄します。
7. Flow Cytometry Staining Bufferで細胞のペレットを再懸濁し、セルカウントと生存率解析を行います。
8. 上記のStep6同様に、細胞を遠心し、最終的な細胞濃度が2×10^7/mlになるように、適量のFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁します。

FLOW CYTOMETRY
PROTOCOLS

Section II: Immunofluorescent Staining

General Notes:

1. 蛍光標識抗体の最適な性能には、バイアルを暗所、4℃で保存してください。凍結はしないでください。
2. 最大抗体量に戻すため、使用する前に、抗体バイアルを素早くスピンします。
3. Protocolの中で述べられた以外でも、染色は、遮光で、on ice又は4℃で行ってください。
4. eFluor™ nanocrystal (NC) 試薬を用いた染色に関しては、一般的な手順の中で青字で述べられています。
5. 細胞内抗原の検出に必要な固定と膜透過の手順は、光散乱特性を変化させ、非特異背景染色を増加させます。染色液にBSA,FCS等のタンパクを加えることで非特異のバックグランドを減少できます。

フローサイトメトリーに役立つサイト:
www.drmr.com/compensation/index.html
www.cyto.purdue.edu/index.htm

II-A. 細胞表面抗原の染色

II-A1. **細胞懸濁液**

試薬/器具:

- 12×75mm 丸底型の試験管あるいは96-well 丸底型マイクロタイタープレート
- 一次抗体（直接標識あるいは精製）
- 必要ならば、2次試薬（間接染色に関して）
- Affinity 精製抗マウスCD16 /32（eBioscience Cat.No.14-0161）
- Affinity精製ヒトFcγR-結合抑制剤(eBioscience Cat.No.14-9161）
- eBioscienceTM Flow Cytometry Staining Buffer(eBioscience Cat.No.00-4222)
- eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat. No. 00-3222)

1. Section Iに記載されているように細胞を準備します。-細胞調製
   eFluorTM nanocrystal (NC) 試薬を含む染色パネルに関して、細胞は、最終的な細胞濃度が2×107/mlになるように、eFluorTMNC Flow Cytometry Staining Bufferで再懸濁してください。
2. [オプション]非特異的なFcが仲介する相互作用のブロック
   マウス細胞の場合：染色前に、氷上で20分間、106の細胞につき0.5-1μg精製抗マウスCD16 /CD32で、細胞を前処理する。
   ヒト細胞の場合：染色前に、氷上で20分間、106の細胞につき20μlのAffinity精製ヒトFcγR-結合阻害剤で細胞を前処理します。
3. 50μlの細胞懸濁液（106の細胞に相当）を各チューブあるいはwellに分注します。
4. 最終的な染色量が100μl（i.e. 50μlの細胞サンプル+50μlの抗体ミックス）になるように、適量のFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で各一次抗体の推奨量を混ぜ合わせ、細胞を加え、穏やかにボルテックスをかけます。
5. 4℃又はon iceで20-30分間インキュベートします。
   NOTE：標準的なインキュベーション時間以外の抗体に関してはテクニカルデーターシートをご参照ください
6. Flow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer)を加えて細胞を洗浄します。チューブの場合、2ml使用し、マイクロタイタープレートの場合は、1wellにつき200μl使用します。4℃で5分間300-400×gで遠心することによって、細胞をペレットにします。洗浄と上清の廃棄をトータルで2回繰り返します。

蛍光色素標識抗体:

7. すべての抗体が、蛍光直接標識であれば、細胞を、500μlのFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) に再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

精製あるいはビオチン標識抗体:

8. 精製あるいはビオチン標識一次抗体を使用する場合は、100μl の Flow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で希釈し、適した蛍光標識第二試薬を細胞に加え、氷上あるいは4℃の暗所で15-30分間インキュンベートします。
9. Flow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer)を加え細胞を洗浄します。チューブの場合、2ml使用し、マイクロタイタープレートの場合は、1wellにつき200μl使用します。4℃で5分間300-400×gで遠心することによって、細胞をペレットにします。洗浄と上清の廃棄をトータルで2回繰り返します。
10. 染色した細胞を500μlのFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

II-A2. ヒト全血の染色

試薬/ /器具:

- ・eBioscience TM 1×RBC Lysis Buffer（eBioscience Cat. No.00-4333）
- ・12×75mm 丸底型の試験管あるいは96-well 丸底型マイクロタイタープレート
- ・一次抗体（直接標識あるいは精製）
- ・必要ならば、２次試薬（間接染色に関して）
- ・Affinity精製ヒトFcγR-結合阻害剤(eBioscience Cat.No.14-9161 ）
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat. No. 00-4222)
- eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat. No. 00-3222)

  NOTE:　eFluorTM nanocrystal (NC) 試薬を用いて赤血球を溶解する前に、サンプル染色を行う場合は、サンプルを、クエン酸ナトリウム緩衝剤の中に直接採取しなければいけません。

1. 100μlの全血をチューブあるいはwellに分注します。
2. [オプション] 染色前に、氷上で20分間、20μlのAffinity精製ヒトFcγR-結合阻害剤を用いて細胞を前処理します。
3. 抗体ミックスの最終的な容量が50μlになるように、適量のFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で一次抗体の推奨量を混ぜ合わせます。細胞を加え、穏やかにボルテックスをかけます。
4. 氷上あるいは4℃の暗所で20-30分間インキュベートします。

NOTE: 標準的なインキュベーション時間以外の抗体に関してはテクニカルデーターシートをご参照ください

5. 各チューブ（マイクロタイタープレートの場合は、1wellにつき200μl）に室温の1×RBC Lysis Bufferを2ml加え、穏やかにピペットをアップ・ダウンします。暗所室温で10分間インキュベートします。RBC Lysis Bufferを用いたインキュベーションは15分を上回ってはいけません。
6. 300-400×g、4℃で5分間サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
7. Flow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer)を追加して二度細胞を洗浄します。チューブの場合2ml、マイクロタイタープレートの場合は、1wellにつき200μl使用します。それぞれの洗浄の後、300-400×g、4℃で5分間遠心します。

蛍光色素標識抗体

8. すべての抗体が、直接蛍光標識であれば、細胞を、500μlのFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) に再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

精製あるいはビオチン標識抗体

9. 精製あるいはビオチン標識一次抗体を使用する場合、100μl のFlow Cytometry Staining Buffer (eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で希釈された、適切な蛍光標識第二試薬を細胞に加え、氷上あるいは4℃の暗所で15-30分間インキュベートします。
10. Flow Cytometry Staining Buffer(eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer)を追加することによって細胞を洗浄します。チューブの場合、2ml使用し、マイクロタイタープレートの場合は、1wellにつき200μl使用します。4℃で5分間300-400×gで遠心することによって、細胞をペレットにします。洗浄と上清の廃棄をトータルで2回繰り返します。
11. 染色された細胞を500μlのFlow Cytometry Staining Buffer(eFluor™ NC Flow Cytometry Staining Buffer) で再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

Ant, quiatur? Vendita tendit pedit, ipis secea cusa volecto reprepe rchiti comnitaque lam nus, ut dolupta tempost,

Section II: Immunofluorescent Staining CONTINUED

II-B. 細胞内抗原の染色

II-B1. サイトカインの染色

以下の手順は、細胞表面分子と細胞内抗原の同時解析を可能にします。

この手順は、in vitroあるいはin vivoにおける活性化の後、個々の細胞におけるサイトカイン産生の検出に役立ちます。サイトカイン産生に適した刺激条件と動態は、解析される細胞型とたサイトカインに依存します。

さらに、in vitroで刺激されたサイトカイン産生の動態は、刺激がin vivoで誘導されるので、しばしば反復されません。従って、実験用モデルに対して、経験的に

検定する必要があります。in vitroの細胞刺激には、刺激プロトコールの最後の4-6時間、eBioscienceTM Monensin Solution (eBioscience Cat/ No.000-4505)あるいはeBioscienceTM Brefelcin Solution (eBioscience Cat/ No.000-4506)のような蛋白輸送阻害剤用いてサイトカインの分泌を阻害する必要があります。

試薬/器具:

- 12×75mm　丸底テストチューブ
- 直接標識一次抗体
- eBioscience™ FixationとPermeabilization Kit
  固定と膜透過キット
  (eBioscience Cat. No. 88-8823)

緩衝剤と溶液調製:

使用前に、10×濃度のPermeabilization Bufferを蒸留水で希釈して、1×希釈標準溶液を準備します。それぞれのサンプルに対して、3-4mlのPermeabilization Bufferが必要です。

1. サイトカイン産生の評価に関して、興味のある細胞を準備します。 Section I：Cell Preparation を参照してください。
2. Protocol　II－A 1 あるいはII－A2に記載されているような細胞表面抗原を染色します。
3. 最後の洗浄の後、上清を廃棄し、完全にペレットが分離するようにサンプルをボルテックスします。
4. チューブをボルテックスしながら、100μlのIC Fixation Bufferを加えることによって、細胞を固定させます。
5. 暗所室温で20分間、インキュベートします。
6. 洗浄をせずに、各チューブに1mlの1×Permeabilization Bufferを加えます。300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
7. 100mlの1×Permeabilization Bufferで細胞ペレットを再懸濁します。
8. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
9. 100μlの1×Permeabilization Bufferで細胞を再懸濁します。
10. 蛍光色素標識一次抗体の推奨量を細胞に加え、暗所室温で20分間インキュベートします。
11. 各チューブに1mlの1×Permeabilization Bufferを加え、ボルテックスします。
12. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
13. 1mlのFlow Cytometry Staining Bufferを加えます。
14. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心にかけ、上清を廃棄します。
15. 染色した細胞を500μlのFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

II-B2. 転写因子の染色

以下の手順は、細胞表面分子と核抗原の同時解析を可能にします。

試薬/器具:

- 12×75mm　丸底テストチューブ
- 直接標識一次抗体
- eBioscience™ Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience Cat. No. 00-5523)
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (eBioscience Cat. No. 00-4222)
- Normal Rat Serum (eBioscience Cat. No. 24-5555)
- Normal Mouse Serum (eBioscience Cat. No. 24-5544)

緩衝剤と溶液調製:

eBioscienceTM Fixation/Permeabilization Diluent(3part)を用いてeBioscienceTM　Fixation/Permeabilization Concentrate(1part)を希釈することによりFixation/Permeabilizationの希釈標準溶液を準備します。各サンプルに1mlのFixation/Permeabilization希釈標準溶液が必要です。

使用前に、蒸留水によって10×の濃度に希釈することによって、Permeabilization Bufferの1×希釈標準溶液を準備します。各サンプルに対して、2-3mlのPermeabilization Bufferが必要です。

使用前に、10×濃度のPermeabilization Bufferを蒸留水でに希釈して、1×希釈標準溶液を準備します。それぞれのサンプルに対して、3-4mlのPermeabilization Bufferが必要です。

1. Section I　Cell　Preparation に記載されているように細胞を準備します。
2. Protocol　II－A 1 あるいはII－A2に記載されているような細胞表面抗原を染色します。
3. 最後の洗浄の後、上清を廃棄し、完全にペレットが分離するようにサンプルをボルテックスします。
4. 各サンプルに1mlのFixation/Permeabilization希釈標準溶液を加えます。
5. 暗所で30-60分間、4℃でインキュベートします。
6. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
7. 1mlの1×Permeabilization Bufferで細胞ペレットを再懸濁します。
8. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
9. [Optional] 1×Permeabilization Buffer（トータル量が約100μl）にnormal mouse/rat serumを2%（2μl）入れて、4℃で15分間ブロックします。
10. 洗浄せずに、蛍光標識一次抗体の推奨量を細胞に加え、暗所で少なくとも30分間、4℃でインキュベートします。
11. 各チューブに1mlの1×Permeabilization Bufferを加え、ボルテックスします。
12. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
13. 1mlのFlow Cytometry Staining Bufferを加えます。
14. 300-400×g 、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
15. 染色した細胞を500μlのFlow Cytometry Staining Bufferで再懸濁し、フローサイトメーターで解析します。

	eBioscience Foxp3 Staining Buffer Set (Cat. No. 00-5523)*	eBioscience Fixation & Permeabilization Kit (Cat. No. 88-8823)*
Transcription factors	+	–
Nuclear proteins	+	NT
Cytokines (Secreted proteins)	+‡	+
Cytoplasmic proteins	NT	+

Intracellular Staining Buffer Selection Guide.
* Components are also sold individually.
‡ Validated for most cytokine proteins
NT = not tested

Section II: Immunofluorescent Staining CONTINUED

C．アポトーシス細胞の検出

II-C1. CD95 (Fas) induced apoptosis of human cells using EOS9.1 mAb

試薬/器具:

- Jurkat（clone E6-1,ATCC Cat.No.TIB-152）のような細胞株あるいは、アポトーシス誘導を起こしやすい初代細胞
- 10%FCSを追加したRPMI-1640メディウム
- Functional Grade™ purified anti-human CD95 (Fas/APO-1), clone EOS9.1 (eBioscience Cat. No. 16-0958)
- 組織培養フラスコあるいは組織培養プレート

1. 組織培養フラスコあるいは組織培養プレートに、10%FCS入りの新たなRPMI-1640メディウムの中0.5×106/mLの細胞濃度で細胞を準備します。
2. 希釈したanti-CD95(0.06-1μg/mlの濃度を推奨)を用いて細胞懸濁液を処理します。適切なnegative control は、メディウムのみで維持された細胞から構成されています。
3. 加湿した、37℃、5%CO2のインキュベータで、一晩（あるいは、用意した細胞型に最適な時間）インキュベートします。
4. 遠心によって細胞を採取し、アポトーシス誘導を評価する為に適したアッセイに移ります。

II-C2. Pharmacologic induction of apoptosis with Camptothecin

試薬/器具:

- 細胞株あるいは、アポトーシス誘導を起こしやすい初代細胞
- 10%FCSを追加したRPMI-1640メディウム
- 1 mM stock solution of Camptothecin prepared in DMSO
- 組織培養フラスコあるいは組織培養プレート

1. 組織培養フラスコあるいは組織培養プレートに、10%FCS入りの新たなRPMI-1640メディウムの中0.5×106/mLの細胞濃度で細胞を準備します。
2. 最終濃度が4-6μMになるように、1mM Camptothecinの適量を細胞懸濁液に加えます。negative control は、DMSOのみを同様に希釈したメディウム中に維持したる細胞から構成されています。
3. 用意した細胞型に最適の時間、5%CO2、37℃の加湿されたインキュベーターで細胞を培養します。細胞がアポトーシスをどれ程センシティブに引き起こすかを知るためにタイムコースを取ることをお勧めします。
4. 遠心によって細胞を採取し、アポトーシス誘導を評価する為に適したアッセイに移ります。

アポトーシス誘導を引き起こすと知られている、その他の薬理試薬は、 Actinomycin D, Aphidocolin, Cycloheximide, Dexamethasone, 5-Fluorouracil, Hydroxyurea, and Staurosporineです。

II-C3. Annexin V Kit for detection of early apoptotic events

Annexinsは、真核分野に豊富に見られるカルシウム依存リン脂質結合タンパク質のファミリーです。Annexin Vは、選択的にホスファチジルセリン（PS）と結合します。通常の生理学条件のもとでは、PSは、inner leafletあるいは、細胞膜の細胞質向き部分に、主に存在します。アポトーシスのの発生により、PSは、リン脂質二重層における非対称分布を失い、食細胞の対象として、細胞を特定する細胞外膜leafletへ移行します。細胞膜の外表面上に移行すると、PSは、Ca2+依存性に蛍光色素標識Annexin Vによって、検出できます。

初期段階のアポトーシスでは、細胞膜は、propidium iodide と7-AAD のようなviability dyesを排除しますので、これらの細胞は、AnnexinVのみに染まります。従って、AnnexinVの結合は、アポトーシスの初期のマーカーとして用いることができます。しかし、アポトーシスの後期では、細胞膜の完全な状態は失われ、Anexin Vは細胞の内部のPSに到達できます。propidium iodide（PI）あるいは、7-AADのようなviability dyeは、初期段階アポトーシス細胞（Annexin V positive,7-AAD あるいはPI negative）から、これらの後期アポトーシス細胞とネクローシス細胞(Annexin Vと7-AADあるいは PI double positive)を分離する際に使用できます。

試薬/器具:

- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience Cat. No. 88-8005) or Annexin V-APC Apoptosis Detection Kit (eBioscience Cat. No. 88-8007)
- Propidium Iodide Staining Solution (eBioscience Cat. No. 00-6990)
- PBS

緩衝剤と溶液調製:

- 10×stockを蒸留水で希釈することにより1×のBinding Buffer を準備します。

  NOTE: Annexin V： PSの相互作用がカルシウムに依存するので、は、Annexin V染色の間、EDTAあるいは、他のカルシウムキレート剤を含む溶液を避けることが重要です。細胞を固定する場合は、細胞膜のinner leaflet へAnnexin Vのアクセスを避ける為の固定の前に、Annnexin Vを用いて、インキュベートします。固定の前に、非結合Annnexin Vを取り除くために、完全に細胞をBinding Bufferで洗浄します。

1. 実験プロトコールに従いアッセイする細胞を準備します。
2. 300-400×g、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
3. 2mlのPBSで細胞ペレットを再懸濁します。
4. 300-400×g、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
5. 2mlの1×Binding Bufferで細胞ペレットを再懸濁します。
6. 300-400×g、4℃で5分間、サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
7. 1-5×106/mlの濃度になるように、1×Binding Bufferで再懸濁します。
8. 穏やかに、5μlの蛍光標識Annexin Vを用いて100μlの細胞懸濁液を穏やかに混ぜ合わせます。
9. 暗所室温で10-15分間インキュベートします。
10. 2mlの1×Binding Bufferで一度細胞を洗浄し、その後、300-400×gで5分間遠心し、上清を廃棄します。
11. 200μの1×Binding Bufferで再懸濁します。
12. 各サンプルに、5μlのPropidium Iodide Staining Solution を加えます。
13. PIシグナルを収集する為に、PEの検出器を使用してフローサイトメーターで解析します。アポトーシスは素早く、活動的な変化ですので、染色後すぐに解析を行われることをお奨めします。
14. 推奨されているコントロールは、フローサイトメーターの設定を最適化するために、Annexin VまたはPIのみで染色した細胞を用います。

Section II: Immunofluorescent Staining CONTINUED

II-C4. Apo-BrdU™ Kit for detection of late stage apoptosis

後期アポトーシス細胞の共通の特徴は、細胞内のヌクレアーゼによるゲノムDNAの切断です。

結果として生じるDNAフラグメントは、フローサイトメトリーによるアポトーシス細胞の特定に利用できる性質の露出した3′-hydroxyl 末端を持っています。酵素末端デオキシヌクレオチド転移酵素（terminal deoxynucleotidyl transferase：TdT）は、アポトーシス細胞において、DNAフラグメントの3′-hydrokyl末端に合成ヌクレオシドアナログであるブロモデキシウリジン三リン酸塩(nucleoside analog bromodeoxyuridine triphosphate)を付加する独立した鋳型を触媒します。これは、BrdUが簡単にアポトーシス細胞のゲノムの中に組み込まれ、蛍光標識抗BrdUモノクローナル抗体で検出するAPO-BrdUTM Kitに利用される方法の基礎を提供します。フローサイトメーターによって測定される蛍光強度は、アポトーシス細胞におけるDNA鎖切断の数に、正比例しています。アポトーシスの過程を経験していない細胞は、露出した3′-hydroxyl DNA末端が欠けているのでBrdUの相当量を組み込まれません。

試薬/器具:

- Apo-BrdU™ Apoptosis Detection Kit (eBioscience Cat. No. 88-6671)
- 12×75mm　丸底テストチューブ
- PBSで1%（w/v）に希釈したパラホルムアルデヒド（ph7.4）

緩衝剤/溶液調製

DNA LABELING SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
TdT Reaction Buffer (green cap)	10.00µl	50.00 µl	100.00 µl
TdT Enzyme (yellow cap)	0.75 µl	3.75 µl	7.50 µl
Br-dUTP (violet cap)	8.00 µl	40.00 µl	80.00 µl
Distilled H_2O	32.25 µl	161.25 µl	322.50 µl
Total Volume	**51.00 µl**	**255.00 µl**	**510.00 µl**

DNA Labeling Solution

NOTE: 1つのアッセイに使用する成分量に基づいて、サンプル数に応じたDNA標識溶液を準備すること。アッセイの当日に、新たなDNA標識溶液を準備します。DNA 標識溶液は、約24時間活性です。

ANTIBODY SOLUTION	1 ASSAY	5 ASSAYS	10 ASSAYS
Flourescein~PRB-1 (orange cap)	5.00 µl	25.00 µl	50.00 µl
Rinse Buffer (red cap)	95.00 µl	475.00 µl	950.00 µl
Total Volume	**100.00 µl**	**500.00 µl**	**1000.00 µl**

Antibody Solution

以下の手順は、Apo-BrdUTM Kitで提供される陽性コントロール細胞と陰性コントロール細胞中のアポトーシスの測定方法を記載しています。同じ手順は、研究者が準備する細胞試料のアポトーシス測定に有用です。60サンプル以上測定可能な十分な試薬が、入っています。

1. 1-2×106cells/mlの濃度の実験用の細胞サンプルを、PBSで1%（w/v）に希釈したパラホルムアルデヒドで固定します。
2. 氷上で30分間細胞をインキュベートします。
3. 300-400×g、4℃で5分間サンプルを遠心し、上清を廃棄します。
4. PBSで2度細胞を洗浄します。それぞれ洗浄後、300-400×g、4℃で5分間遠心し細胞をペレットにします。
5. 最後の洗浄の後、上清を廃棄し、完全にペレットを分離する為にサンプルをボルテックスします。
6. 1-2×106cells/mlの濃度に、70%（v/v）の冷エタノールで再懸濁し、氷上で少なくとも、30分間インキュベートします。いくつかのケースでは細胞を70%（v/v）のエタノールで-20℃で12-18時間保存するとベストな結果が得られます。更に細胞を70%（v/v）のエタノールで-20℃で数か月保存することも可能です。
7. 細胞懸濁液の1mlの一定分量を取り出し、12×75mmフローサイトメトリー遠心チューブに設置します。
8. 陽性(brown cap)と陰性(natural cap)対照細胞は、すでに決定され、70%エタナール中に供給されています。バイアルを回転させることによって対照細胞を再懸濁します。
9. 対照細胞懸濁液の1mlの一定分量（約1×106cells/ml）を取り出し、12×75mmフローサイトメトリー遠心チューブに設置します。
10. 300-400×g、4℃で5分間、すべてのサンプルを遠心し、上清を廃棄します。
11. 1mlのWash Buffer (blue cap)で2度細胞を洗浄します。それぞれ洗浄後、300-400×g、4℃で5分間の遠心によって細胞をペレットにします

12. 50μlの準備したDNA標識溶液で、細胞ペレットを再懸濁します。
13. 37℃で60分間恒温槽で、DNA標識溶液に入った細胞をインキュベートします。再懸濁の為、15分毎に細胞を振ります。

    NOTE: DNA標識反応は、対照細胞に対して、22-24℃で一晩実行もできます。キットに提供されている対照細胞以外のサンプルに関しては、37℃でのインキュベート時間は、研究者によって提供される細胞の特徴次第で、より長いあるいは、より短い期間に調製されます。
14. 1mlのRinse Buffer (red cap)で2度細胞を洗浄します。それぞれ洗浄後、300-400×g、4℃で5分間の遠心によって細胞をペレットにします。
15. 0.1mlの準備された抗体溶液で細胞ペレットを再懸濁します。
16. 蛍光~PRB-1 抗体溶液を用いた細胞を暗所室温で30分間インキュベートします。
17. 0.9mlのPropidium Iodide/ RNase A Solution(amber bottle)を0.1mlの抗体染色溶液を含むチューブに加えます。

    NOTE: 細胞濃度が低い場合はPI/RNase A solution を0.5ml.に減少させます。
18. 暗所室温で30分間細胞をインキュベートします。
19. フローサイトメーターでPropidium Iodide/ RNase A Solutionに入った細胞を解析します。
20. 3時間の染色以内に細胞を解析します。

FLOW CYTOMETRY
PROTOCOLS

Section I: Light Scatter Properties

FSC AND SSC PROFILES

固定と膜透過化の細胞にもたらす影響

フローサイトメーターのデータを解析する場合、従来より、細胞の光散乱の性質に基づいてゲートを設定する（解析したい細胞分画の範囲を選び取る）ことから始められている。光散乱と言う場合、前方散乱（FSC）と側方散乱（SSC）の物理的性質を意味している。側方散乱は細胞がどの程度顆粒状の構造を含むかの尺度であり、前方散乱は細胞の大きさの見積もりを与える。細胞内の抗原例えば、可溶性のサイトカインとか核内の転写因子とか、を分析するために行う固定と膜透過化は細胞の光散乱の性質に影響を与える。一般的に細胞の固定は、装置を立ち上げた時に、目的とする細胞画分が識別できるように設定するのに必要な細胞の前方散乱及び側方散乱を低減させる。固定と膜透過化が細胞の光散乱にどのような影響を与えるかを理解することは、信頼できる解析のために適切なゲートを設定するのに助けとなる。

図１（右）はマウスもしくはヒトの典型的なデータを示す。サンプルは生細胞の状態で、あるいは細胞内の細胞質蛋白（eBioscience 固定・膜透過化キット、Cat. No.88-8823）の染色のために調製されて、あるいは核蛋白（eBioscience FoxP3染色バッファーセット Cat.No. 00-5523）の染色のために調製されて解析された。付随してあるデータは蛍光パラメータ、この場合は、蛍光色素（APC）でラベルした抗CD45抗体と、目的とする細胞画分を同定するための光散乱の組み合わせの有用性を示すために表示してある。この例でCD45、白血球共通抗原（LCA）により、白血球が、残っている赤血球や死細胞・残骸と区別される。蛍光色素でラベルした抗原と光散乱との組み合わせは核蛋白の染色、これを行うの場合固定と膜透過化は細胞の光散乱に劇的な効果を及ぼすのであるが、においてゲートを適切に設定するために特に有用である。

MOUSE SPLEEN

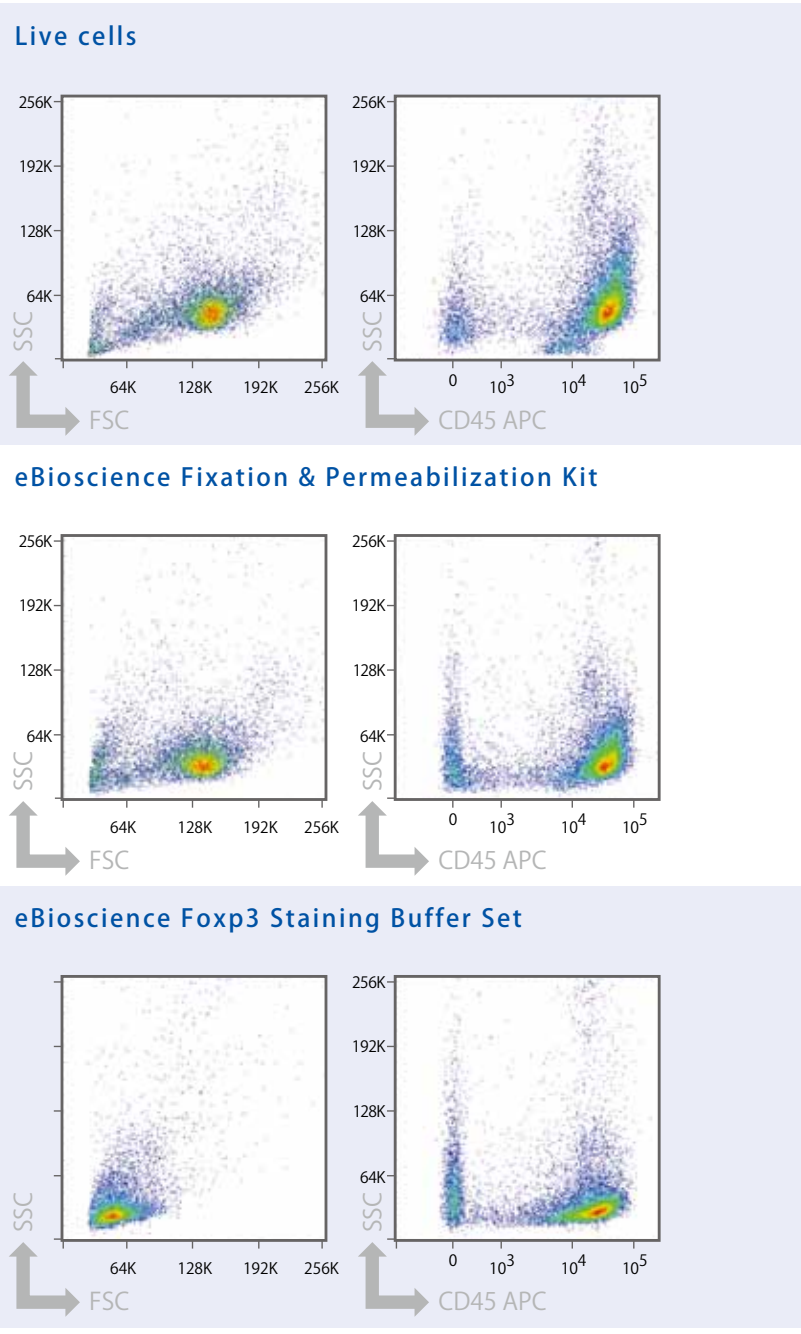
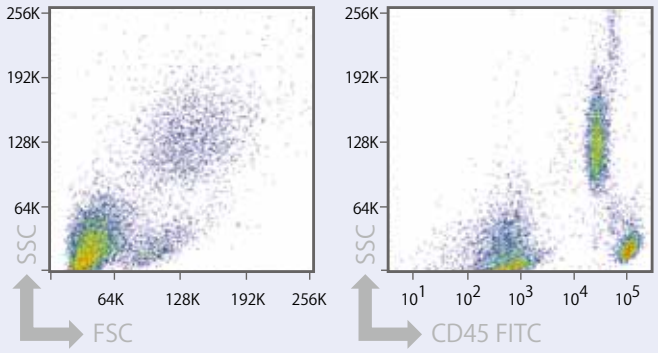
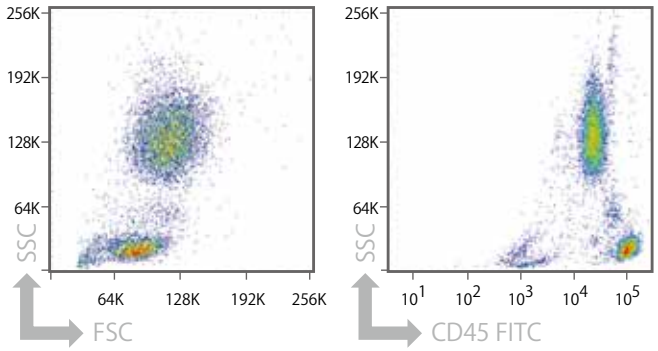
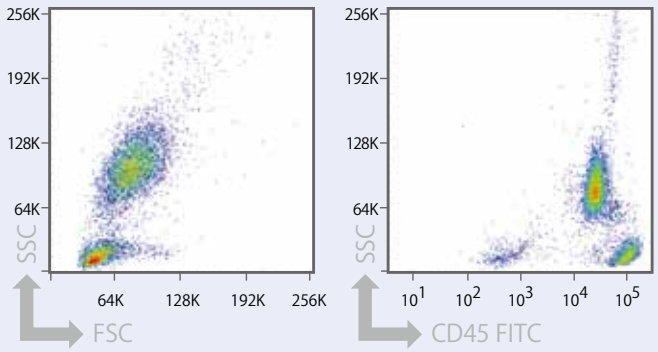


Figure 1: Fixation and Permeabilization.

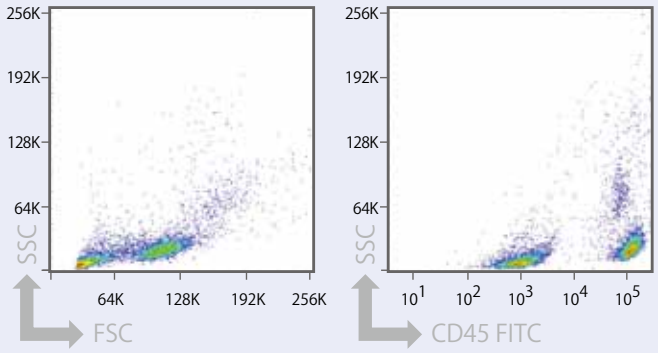
HUMAN LWB (Lysed Whole Blood)

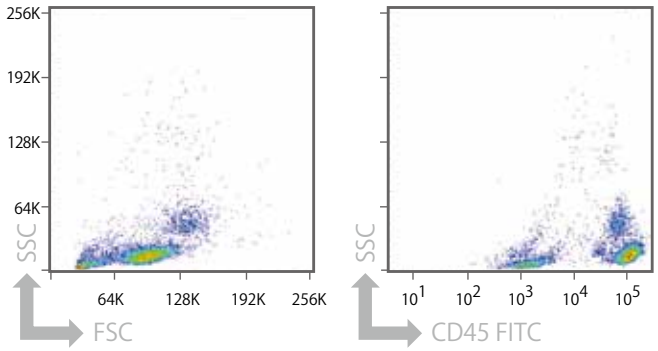


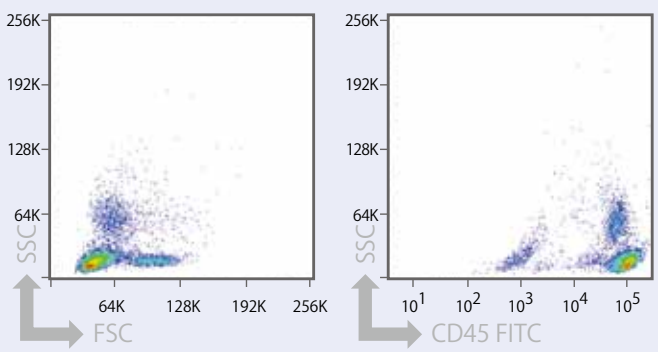




HUMAN PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)







Section II: Choosing Fluorochromes

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY

フローサイトメーターのための最適な多色のパネル (抗体の組み合わせ)のデザイン

生命化学における最先端の問題を解明するために研究者達がより高機能のモデルを開発するに従い、その研究に関連のある手法の改革もともに歩みを進めなくてはならない。多色フローサイトメーターは、多種の細胞が入り交じった中で特定の細胞に関する詳細なデータを収集する土台となるシステムを提供する。多パラメータのフローサイトメーターの威力を遺憾なく発揮させるためには、一貫したそして信頼性の高いデータを得るための適切な抗体と組み合わされた高機能の蛍光色素が必要である。しかし、多色の染色パネルをデザインするには、事前の入念な検討・計画が必要である。というのも、場当たり的な抗体と色素の組み合わせが最適であることはほとんど望めないからである。フローサイトメーターのための最適な多色の染色パネルをデザインするにあたり、注意するべき検討事項が幾つかある。

1. まず第一の、そして最も重要な点は、
   a. 利用可能なレーザー、
   b. 蛍光色素を検出するためのフィルターセット、
   の 2 点を含む、フローサイトメーターの構成を知っておくことである。
2. 実験に用いられる装置における、種々の蛍光色素の特長を理解し、そして如何にして目的とする分子と蛍光色素の最適な組み合わせを得るか。
3. 蛍光色素のスペクトルの重なりとコンペンセーションの問題について理解しておくこと。
4. 装置を正確に設定し、データを高い信頼性の下に解釈ができるような適切なコントロールを知っておくこと。

この節の残りでは、この重要な 4 点に関してより詳細に議論していく。

サイトメーターの構成

使用される装置の仕様は、通常、製造業者から渡される詳細マニュアルに記載されている。多色染色の組み合わせをデザインする場合、用いられる蛍光色素は、使用可能なレーザー、個々の検出器に用いられるダイクロイック及びバンドパス　フィルターにより自ずと決まってくる。

表 1 に、eBioscience社より供給されている蛍光色素に関する、励起用レーザー、放出スペクトル、推奨されるフィルターの構成が示してある。この情報が把握されていれば、用いる装置に対してどの蛍光色素が利用可能かを決めることは容易である。多パラメータのフローサイトメーターにおいて、利用可能であれば常に蛍光色素を直接ラベルした抗体を用いるべきである。というのも、そうすることにより、2次試薬がその染色パネルにおける他の抗体と交差反応することを避けられるからである。

Fluorochrome	Excitation Laser (nm)	Emission maximum (nm)	Dichroic Pass Filter	Band Pass Filter
eFluor™ 450	405, 407	450	—	440/40, 450/50
Pacific Blue	405, 407	455	—	440/40, 450/50
eFluor™ 605^{NC}	355, 405, 407	605	595 LP	605/40
eFluor™ 625^{NC}	355, 405, 407	625	595 LP	605/50
eFluor™ 650^{NC}	355, 405, 407	650	630 LP	660/40
FITC	488	518	—	530/30
Alexa Fluor® 488	488	519	—	530/30
PE	488	575	550 LP	575/26, 585/40
PE-Cy5	488	667	635 LP	670/14, 695/40
PE-Cy5.5	488	695	685 LP	695/40
PerCP-Cy5.5	488	695	685 LP	695/40, 710/40
PE-Cy7	488	785	735 LP	780/60, 780/40
APC	633, 635, 640	660	—	660/20
Alexa Fluor® 647	633, 635, 640	668	—	660/20
Alexa Fluor® 700	633, 635, 640	723	685 LP	710/40, 710/50, 720/45
APC-eFluor™ 780	633, 635, 640	780	735 LP	780/60
APC-Alexa Fluor® 750	633, 635, 640	775	735 LP	780/60

NOTE: これは、完璧なリストではなく、他のフィルターも適用可能であり各自の装置の構成に照らして検討して頂きたい

表 1：eBioscience社製蛍光色素の分光学的特徴と推奨されるフィルター

蛍光色素の特性

蛍光色素は、それが生成するシグナル強度が異なる。相対的なシグナル強度に基づき蛍光色素を順序付ける有用な尺度は、染色係数（stain index）である。染色係数は、陽性細胞集団と陰性細胞集団それぞれの平均値の差を、陰性細胞集団の標準偏差の2倍で割った値である

$$\text{染色係数} = \frac{Mean_{\text{陽性細胞}} - Mean_{\text{陰性細胞}}}{2 \times SD_{\text{陰性細胞}}}$$

この定義は、わずかに陽性である細胞を陰性細胞から識別する能力に関して時として大きな影響を与える、考慮している検出器における陰性細胞（或いは非特異的シグナル）の影響を考慮に入れている。例えば、図１（右）に示されているデータは、マウス脾細胞をeBioscienceで出している蛍光色素でラベルしたそれぞれの抗CD4抗体で染色した場合の染色計数を示したグラフである。最も大きな染色計数を持つ蛍光色素は、フローサイトメーターに於いてわずかに陽性の細胞を識別し得る可能性が最も高いであろう。この情報は多色の染色パネルをデザインする場合にどの蛍光色素をどの抗体に割り当てるかを決める際に有用である。一般的に、最も明るい色素（最大の染色計数を持つ）は発現レベルの最も低い抗原に割り当てるのが最良の組合わせとなるであろう。というのも、こうすることにより陽性細胞の分離を最も良くするからである。付け加えて言えば、調べたい細胞種において、実際の発現量が解らなかったり不均一である場合に、そのマーカーの発現量を調べる場合には明るい蛍光色素を用いることが薦められる。蛍光色素のシグナル強度に基づいて多色の染色パネルをデザインする場合、スペクトルの重なりに対するコンペンセーション（補正）がそのパネルの中のそれぞれの色素のシグナル強度に影響を与えることは、注意して頂きたい。

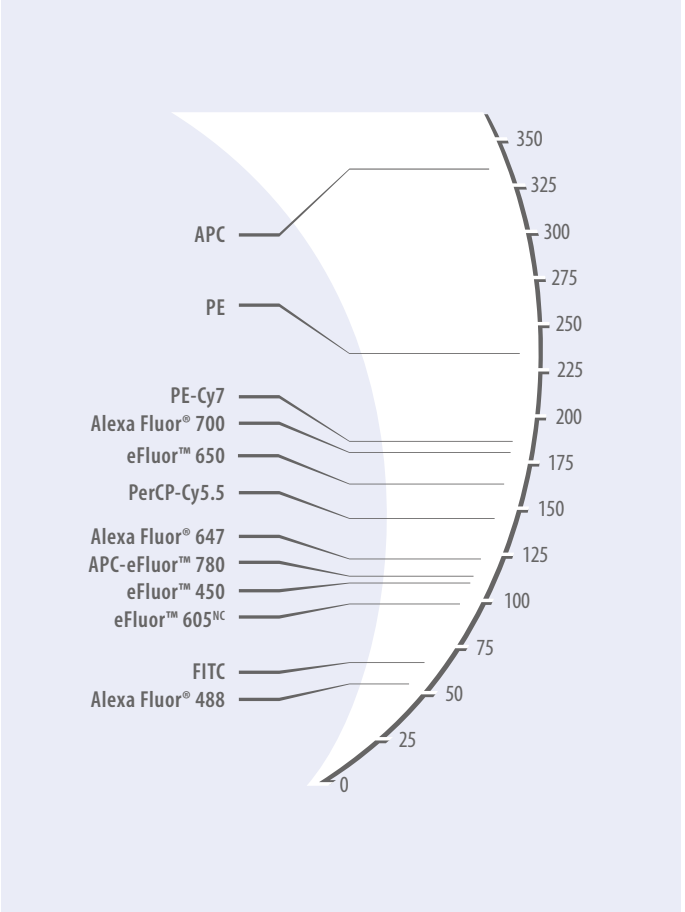


図１. 蛍光ラベル化抗CD4抗体の染色係数
マウス脾細胞を、表に示されているeBioscience社の蛍光色素で染色した。未補正のデータはLSRIIフローサイトメータにより収集された。

Section III: Spectral Overlap & Compensation

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY

スペクトルの重なり

スペクトルの重なり（他の検出器への漏出）は、多色の染色パネルをデザインする場合に十分検討されなくてはいけない事項である。多色の蛍光染色を行った試料から信頼の出来るデータを得るには、注目する蛍光色素以外の蛍光色素を検出するための検出器へ漏れたシグナルを除くための補正（コンペンセーション）を行う必要がある。何本かのレーザーを装着した装置では、レーザー内での、及びレーザー間でのコンペンセーションを行う必要がある。正しいコンペンセーションの値を設定するためには、その染色パネルで用いられるそれぞれの蛍光色素単独で染色された試料が必要である。

スペクトルの重なりについて目で見て解るように示したものが図２（右）である。この例ではマウス脾臓細胞はPE ラベル化抗CD4抗体のみで染色され、蛍光シグナルは、それぞれ励起用のレーザーに対応する、表に記載してある全ての検出器で検出された。点線で示したヒストグラムは未補正のデータを表しており、PEで染色された試料からの蛍光シグナルが他の検出器へ漏れ出ていることが示されている。PEはブルーレーザー（488nm）で最もよく励起されるので、FITC, PerCP-Cy5.5, 及びPE-Cy5.5の検出器にみられるシグナルはレーザー内コンペンセーション、言葉を換えて言うと、ブルーレーザーで最もよく励起される他の色素に対する検出器へ漏れたシグナルを除くこと、の必要性を示している。時として、ある蛍光色素は他のレーザーによってもかなり強く起され、蛍光シグナルはそのレーザーに対応する検出器へも漏れ出ることもあり、この様な場合レーザー間のコンペンセーションが必要となる。この例では、PEはヴァイオレットレーザー（405nm）でも励起され、蛍光シグナルはeFluor605用の検出器にもはっきりと現れる。実線で囲んだ灰色のヒストグラムは同じPEラベル化抗CD4抗体で染色したサンプルのデータにコンペンセーションを行ったものである。適切なコンペンセーションを行うことによりPEからの他の検出器へのシグナルの漏れは完全に除かれ、意図した検出器のみからの検出が可能となる

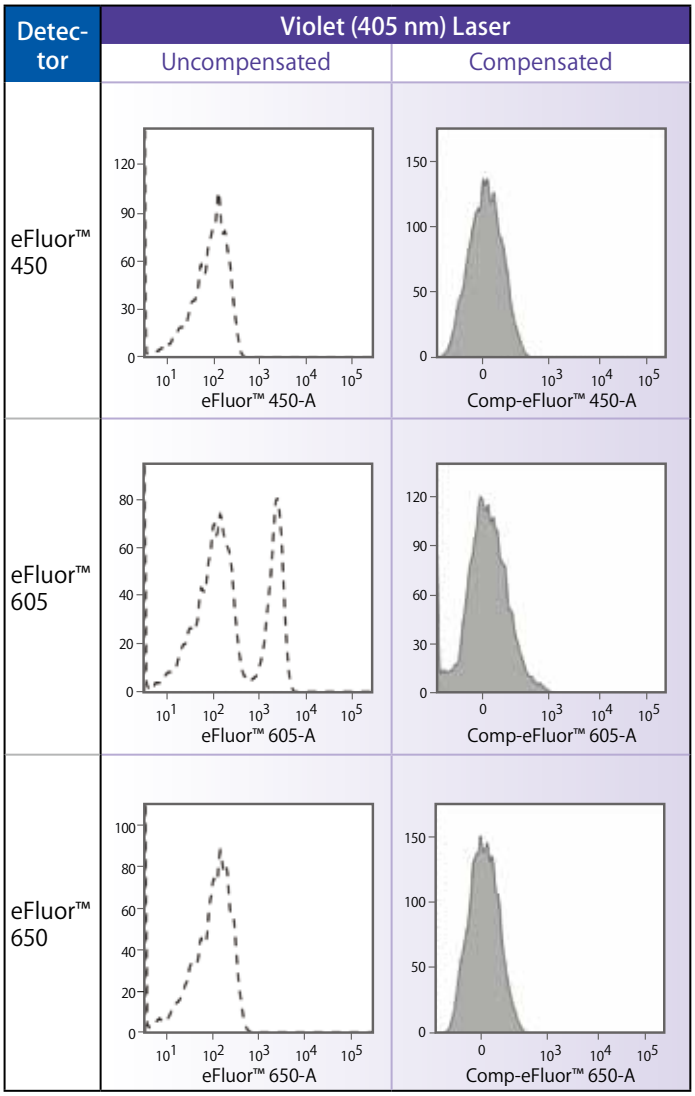
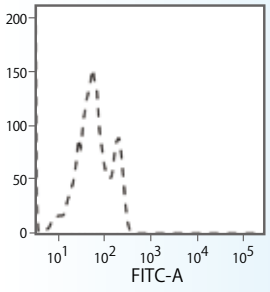
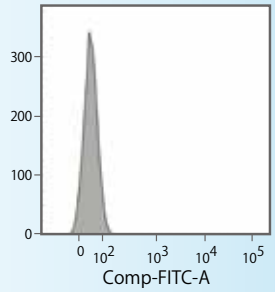
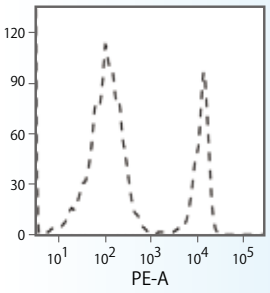
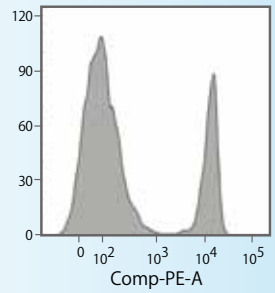
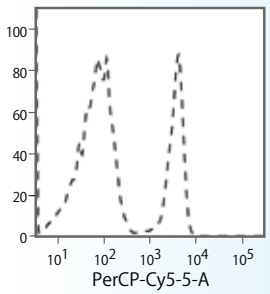
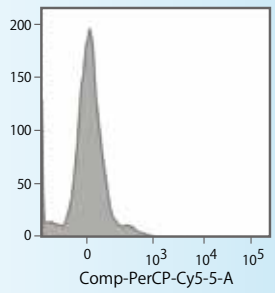
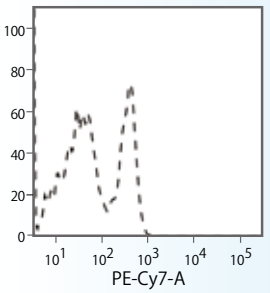
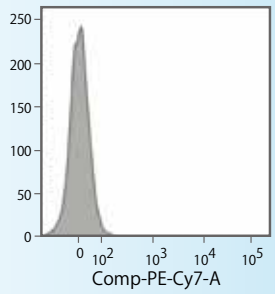
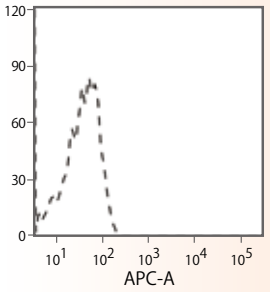
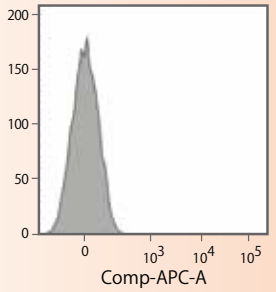
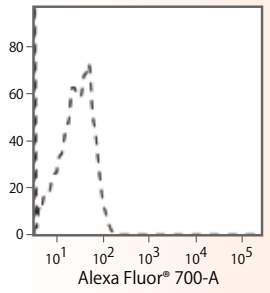
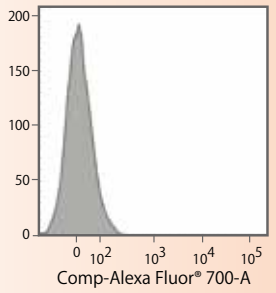
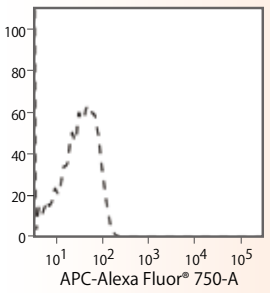
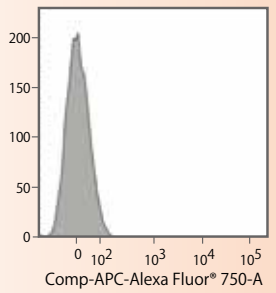


図２. PEとのスペクトルが重なる例
マウス脾臓細胞を、PEでラベルした抗CD4抗体で染色し、蛍光シグナルをLSRIIに装着してある、バイオレットレーザー（405nm）、ブルーレーザー（488nm）、レッドレーザー（633nm）に対応したそれぞれの検出器（表示）で検出された。点線のヒストグラムは未補正のデータ、実線で囲んだ灰色のヒストグラムはコンペンセーションを行った後のデータである。

Detector	Blue (488 nm) Laser	
	Uncompensated	Compensated
FITC		
PE		
PerCP-Cy5.5		
PE-Cy7		

Detector	Red (633 nm) Laser	
	Uncompensated	Compensated
APC		
Alexa Fluor® 700		
APC Alexa Fluor® 750		

Section III: Spectral Overlap & Compensation CONTINUED

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY

コンペンセーション

１０色の染色パネルのコンペンセーション　マトリックス（補正行列）の例を表２（下）に示してある。この値はマウス脾臓細胞を、表示してある色素でラベルした抗CD4 抗体でそれぞれ染色した試料により求められた。この種の情報からある蛍光色素の組み合わせは他の蛍光色素の組み合わせよりかなり大きなコンペンセーションを必要とすることが明らかである。コンペンセーションは最終的には、他の蛍光色素からのシグナルが漏れ込む検出器の識別感度を落とす。試薬の組み合わせをデザインする時には、可能なら蛍光スペクトルの重なりを出来るだけ小さくすることが望ましい。例えば、染色試薬の組み合わせがFITCとPEでラベルした抗体を含む場合、高発現の抗原でなく中程度の発現の抗原をFITCに割り当てるなら、PE用の検出器に漏れ出るシグナルを軽減するために必要なコンペンセーションの量を減らすことができ、それ故PEで染色された画分の識別能が改善される。また、もしあるパネルが、ある一つの細胞種上の２つ以上の抗原を認識する試薬を含む場合、異なるレーザーで励起される色素の組を選ぶべきであり、その事によってシグナルの漏れを最小にすることができる。タンデム蛍光色素に関する注意するべき点としては、それらが周囲の光や、高温、固定液にさらされた場合に退色してしまう可能性である。この問題は、推奨されている保存法や取り扱い法に従うことによって大方避けることが可能である。タンデム色素の最善のコンペンセーションを行うには、タンデム色素単独で染めたコントロールを、実験の試料と同じ条件下で行うことである。

適切なコントロールの使用

多色の染色パネルのデザインの最後の段階は適切なコントロールを用いて、そのパネルの妥当性を確認することである。細胞集団が忠実に分離・識別されていることを確認するには、１つの抗体のみで染色された試料と完全なパネルで染色された試料を比較することである。

蛍光１試薬除外(Fluorescence-Minus-One, FMO)コントロールは、注目する１つの試薬を除いた、パネル内の残る全ての試薬で染色したものである。ＦＭＯコントロールは、他の方法が非現実的であるか不可能である場合に、問題としている試薬の感度を評価し、ゲートを設定する場合にも役に立つ。

ひとたび、ある染色パネルに関する妥当性の検討が十分な角度からなされたなら、日常的な実験の基礎として、必ずしも全ての妥当性の検討を行う必要はない。

% Fluorochrome in Detector

Stain	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	Alexa Fluor® 700	APC-Alexa Fluor® 750	eFluor™ 450	eFluor ™ 605NC	eFluor™ 650NC
FITC		16.52	3.37	0.27	0.00	0.00	0.09	0.27	1.51	0.24
PE	1.10		27.52	2.01	0.01	0.00	0.00	0.00	16.99	1.02
PerCP-Cy5.5	0.00	0.01		11.48	2.19	19.35	3.09	0.00	0.00	1.43
PE-Cy7	0.08	1.62	3.50		0.05	0.11	5.34	0.00	0.20	0.01
APC	0.00	0.00	0.74	0.11		29.46	5.10	0.00	0.03	1.06
Alexa Fluor® 700	0.00	0.00	5.29	0.86	0.62		25.70	0.06	0.32	0.00
APC-Alexa Fluor® 750	0.00	0.00	0.16	1.86	22.80	8.84		0.22	0.00	0.44
eFluor™ 450	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01		1.47	0.00
eFluor™ 605NC	0.00	0.41	0.06	0.00	0.06	0.00	0.03	0.15		1.02
eFluor™ 650NC	0.00	0.00	31.83	0.08	77.17	5.83	0.00	0.09	6.02	

表２. コンペンセーション行列
コンペンセーション値は、表に示された蛍光色素でラベルされた抗CD4抗体で染色されたマウス脾臓細胞を用いて計算された。値は、染色されたサンプルからそれぞれの検出器への漏れを%で表してある。

NOTES:

MEMO:

MEMO:

full spectrum cell analysis
eBioscience™

輸入販売元：
アフィメトリクス・ジャパン株式会社
〒105-0013 東京都港区浜松町1-24-8 ORIX浜松町ビル7F
TEL：03-6430-4020　FAX：03-6430-4021

代理店

東日本
中部　販売元

ノベルサイエンス株式会社
NOVEL SCIENCE Co.,Ltd.
〒113-0033 東京都文京区本郷7丁目2番1号
TEL (03)5842-2901　FAX (03)5842-2905

西日本販売元

WAKEN 和研薬株式会社
WAKENYAKU CO., LTD.
本　　社 〒606-8171 京都市左京区一乗寺西水干町17番地
西日本営業部 〒525-0029 滋賀県草津市下笠町945番地1
TEL(077)568-2911／FAX(077)568-2944
本社営業部(075)721-8111　京阪奈営業所(0774)65-2521
滋賀営業所(077)568-2481　神戸営業所(078)306-6060
大阪営業所(072)749-5200　http://www.wakenyaku.co.jp